

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus

Eine seltene und sich langsam teilende Fraktion von Zellen
der akuten lymphatischen Leukämie
im Knochenmark von NSG-Mäusen ist chemoresistent

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)



an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Sebastian Tiedt
aus Heilbronn-Neckargartach

München, Januar 2014

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München**

Betreuer:	Prof. Dr. Olivier Gires
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Stefan Lichtenthaler
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	14.07.2014

Eidesstattliche Versicherung

Tiedt, Sebastian

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Eine seltene und sich langsam teilende Fraktion von Zellen der akuten lymphatischen Leukämie im Knochenmark von NSG-Mäusen ist chemoresistent

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	4
Abkürzungen.....	6
1. Zusammenfassung	8
2. Abstract.....	9
3. Einleitung	10
3.1. Zellruhe und Resistenz gegenüber Chemotherapie.....	10
3.2. Adulte Stammzellen, Zellruhe und LRCs	12
3.3. Stammzellen und Stammzellnischen	15
3.4. Tumorinduzierende Zellen und das Krebsstammzell-Konzept	17
3.5. Wachstum von Leukämien und soliden Tumoren	20
3.6. Zielsetzung dieser Arbeit	23
4. Material und Methoden	24
4.1. Material.....	24
4.1.1. Geräte und Software.....	24
4.2. Medien und Lösungen.....	25
4.2.1. Reagenzien der Bakterien- und Zellkultur	25
4.2.2. Plasmide	27
4.2.3. Primer	27
4.2.4. Enzyme	28
4.2.5. Antikörper	28
4.2.6. Kommerzielle Reagenziensätze	28
4.3. Molekularbiologische und gentechnische Methoden	29
4.3.1. Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion	29
4.3.2. Kolonie-PCR	29
4.3.3. Enzymatische Hydrolyse von Nukleinsäuren	30
4.3.4. Mutation einzelner Basenpaare	31
4.3.5. Ligation von Nukleinsäuren	31
4.3.6. Agarose-Gelelektrophorese	31
4.3.7. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen.....	32
4.3.8. Mengenbestimmung von DNA und Sequenzanalyse	32

4.4. Mikrobiologische Methoden.....	33
4.4.1. Kultivieren von <i>E. coli</i> DH5α	33
4.4.2. Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen nach der Mehr-Ionen-Methode.....	33
4.4.3. Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E.coli</i> -Zellen	33
4.5. Zellbiologische Methoden.....	34
4.5.1. Kultivieren, Einfrieren und Auftauen von humanen Zellen	34
4.5.2. Stimulation mit zytotoxischen Agenzien	35
4.5.3. Virusproduktion in HEK-293T-Zellen	35
4.5.4. Bestimmung des Virustiters	36
4.5.5. Färbung von Zellen.....	36
4.5.6. CFSE-Markierung von Zellen	37
4.5.7. Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometrie	38
4.5.8. Sortieren von Zellen mittels MACS.....	39
4.5.9. Sortieren von Zellen mittels FACS	39
4.6. Maus-Xenograft-Modell	40
4.6.1. Expansion und Gewinnung primärer ALL-Zellen.....	41
4.6.2. Herstellung transgener Xenograftzellen	41
4.6.3. <i>In vivo</i> Bildgebung	42
4.6.4. Isolierung von Xenograftzellen aus Mausknochenmark.....	42
4.6.5. Isolierung unterschiedlich proliferierender Xenograftzellen.....	43
4.6.6. LDТА.....	43
4.6.7. <i>In vivo</i> Therapie	43
4.6.8. BrdU-Markierung von Xenograftzellen <i>in vivo</i>	44
5. Ergebnisse	45
5.1. Generierung von dreifach transgenen ALL-Xenograftproben	45
5.1.1. Klonierung der Transfervektoren und Virenproduktion.....	46
5.1.2. Transduktion von ALL-Xenograftzellen	51
5.2. Isolierung von transgenen ALL-Xenograftzellen aus murinem Knochenmark.....	56
5.3. Untersuchung des spontanen Wachstums von Xenograftzellen im Knochenmark von NSG-Mäusen	61
5.4. Identifizierung und Charakterisierung von sich unterschiedlich schnell teilenden ALL-Xenograftzellen.....	71

5.4.1.	Verhalten von LRC und LLCs während der Entwicklung der Leukämie	71
5.4.2.	Wachstumsverhalten wird von äußeren Einflüssen bestimmt.....	75
5.4.3.	LRCs haben keine höhere Stammzellfrequenz als LLCs.....	77
5.5.	Die Apoptose-Sensitivität unterschiedlich proliferierender Xenograftzellen variiert <i>in vivo</i> aber nicht <i>in vitro</i>	84
5.5.1.	Kein Unterschied der Apoptose-Sensitivität von unterschiedlich proliferierenden Xenograftzellen <i>in vitro</i>	84
5.5.2.	Apoptose-Sensitivität unterschiedlich proliferierender Xenograftzellen <i>in vivo</i>	87
5.6.	Vergleichende Genexpressionsanalysen	94
6.	Diskussion	98
6.1.	Etablierung der neuen Isolationsmethode.....	98
6.2.	Beschreibung des Wachstums von ALL-Xenograftzellen <i>in vivo</i>	101
6.3.	Proliferationsverhalten und LRCs.....	103
6.4.	Chemoresistenz von LRCs.....	107
6.5.	Vergleichende Genexpressionsanalysen	109
6.6.	Zusammenfassung und Hypothese	111
6.7.	Weiterführende Untersuchungen	113
6.8.	Ausblick	115
7.	Literatur.....	116
8.	Danksagung.....	128
9.	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
10.	Publikationen	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	24
Tabelle 2: Verwendete Software.....	24
Tabelle 3: Plasmide	27
Tabelle 4: Primer.....	27
Tabelle 5: Enzyme	28
Tabelle 6: Antikörper.....	28
Tabelle 7: Reagenziensätze	28
Tabelle 8: Ausstattung der Durchflusszytometer	38
Tabelle 9: Virentiter.....	51
Tabelle 10: Verwendete prä-B-ALL-Xenograftproben.	52
Tabelle 11: Reduktion der Zellzahl durch MACS.....	58
Tabelle 12: Validierung der Detektionsmethode.....	60
Tabelle 13: LDTA-Zellzahlen	78
Tabelle 14: Verwendete Zytostatika	85
Tabelle 15: Top 50 Gene	94
Tabelle 16: Genexpression von Oberflächenmarker	96

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der CFSE-Färbung (modifiziert nach Parish 1999)	14
Abbildung 2: Hämatopoetische Stammzellnische	17
Abbildung 3: Tumorinduzierende Zellen	18
Abbildung 4: Verwendete DNA-Moleküle.	46
Abbildung 5: Nachweis der Punktmutation.....	47
Abbildung 6: Kontrollverdau des Ligationsproduktes.	49
Abbildung 7: Kolonie-PCR der Ligationsprodukte.	50
Abbildung 8: zur Virenproduktion verwendete Vektoren.	51
Abbildung 9: Sortieren der transfizierten ALL-Xenograftzellen.	53
Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Analyse transduzierter ALL-Xenograftzellen.	54
Abbildung 11: Nachweis der Transgenexpression mittels Durchflusszytometrie.	54
Abbildung 12: Nachweis der Transgenexpression mittels in vivo-Bildgebung.	55
Abbildung 13: Quantifizierung der Transgenexpression	55
Abbildung 14: Schema der Isolationsmethode.	56
Abbildung 15: Gating-Strategie der FACS-Isolierung.....	57
Abbildung 16: Validierung der Detektionsmethode.	59
Abbildung 17: Reanalyse sortierter Zellen.....	61
Abbildung 18: Anteil der im Knochenmark anwachsenden Xenograftzellen.	62
Abbildung 19: Verlauf einer Xenograft-Leukämie.....	63

Abbildung 20: Wachstum der ALL-Proben im Knochenmark.	63
Abbildung 21: Überlagerung von Wachstumsmodellen	66
Abbildung 22: Doppelfärbung mit BrdU und CFSE.	68
Abbildung 23: Korrelation von CFSE-Signal und Zellzahl	69
Abbildung 24: CFSE-Kinetiken der Proben 199, 233 und 265.	70
Abbildung 25: Unterscheidung zwischen LRCs und LLCs	73
Abbildung 26: Anzahl LRCs	74
Abbildung 27: Anteil der LRCs im zeitlichen Verlauf	74
Abbildung 28: Retransplantation von LLCs.	76
Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf des LDTAs der Probe 199.	79
Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf des LDTAs der Probe 265.	80
Abbildung 31: LIC-Frequenz 199 von zehn transplantierten Zellen.	81
Abbildung 32: LIC-Frequenz der Probe 199.	82
Abbildung 33: LIC-Frequenz der Probe 265.	82
Abbildung 34: Apoptose-Sensitivität der Proben 199 und 265.	86
Abbildung 35: Kurzzeit-Apoptose-Assay LRCs und LLCs.	87
Abbildung 36: <i>in vivo</i> Therapie von 199.	89
Abbildung 37: <i>in vivo</i> Therapie von 265.	89
Abbildung 38: Quantifizierung der <i>in vivo</i> Therapie.	90
Abbildung 39: Xenograftzellen im Knochenmark nach Therapie.	91
Abbildung 40: CFSE-Verteilung nach Therapie.	92
Abbildung 41: Anteil LRCs nach Therapie.	92
Abbildung 42: Reduktion der LRC-Zellzahl und Gesamtzellzahl durch <i>in vivo</i> -Therapie.	93
Abbildung 43: Hypothese	111

Abkürzungen

A	Adenine
A600	Absorption bei 600 nm
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AMS	Amsacrin
AnnV	Annexin V
B-ALL	ALL mit B-lymphozytärer Differenzierung
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
BP	Bandpass
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CFSE	5-(6)-Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester
d	Tag
d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOX	Doxorubicin
<i>E. coli</i>	gram-negatives Bakterium (<i>Escherichia coli</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPI	Epirubicin
et al.	und andere
ETO	Etoposid
Fa.	Firma
FCS	Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC/SSC	Forward Scatter/Side Scatter
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²), auch Gramm
h	Stunde

k	kilo ($\times 10^3$)
l	Liter
LB	lysogeny broth
LDTA	limiting-dilution transplantation assay
LLC	markierungsverlierende Zellen (label losing cells)
LP	Langpass
LRC	markierungsbehaltende Zellen (label retaining cells)
Lsg	Lösung
M	molar [$1\text{ M} = 1\text{ mol/l}$]
m	Meter, auch milli ($\times 10^{-3}$)
max.	maximal
μ	mikro ($\times 10^{-6}$)
MCS	multiple cloning site
min	Minute
mind.	Mindestens
mol	Einheit der Stoffmenge [$1\text{ mol} \approx 6 \times 10^{23}$ Moleküle]
mRNA	messenger ribonuclein acid
n	nano ($\times 10^{-9}$)
NSG	non obese diabetic / severe combined immunodeficiency / gamma chain depleted (NOD.Cg- <i>Prkdc</i> ^{scid} <i>Il2rg</i> ^{tm1Wjl} /SzJ)
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
rpm	rounds per minute
ROI	Analysebereich (region of interest)
RPMI-1640	Zellkulturmedium, entwickeln am Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
sr	Steradian
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tm	Schmelztemperatur
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCR	Vincristin
z.B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

Immer noch versterben etwa 50 % der Erwachsenen und mehr als 10 % der Kinder mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) an ihrer Tumorerkrankung, weshalb eine Verbesserung der Therapie der ALL dringend notwendig ist. Ruhende Zellen stellen eine therapierelevante Subfraktion von Tumorzellen dar, weil sie Krankheitspersistenz und -rückfall induzieren können. Studien an ruhenden ALL-Zellen waren bisher unmöglich, weil ruhende Zellen nicht isoliert werden konnten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur Isolierung von ruhenden ALL-Zellen zu entwickeln und damit zu beginnen die isolierten Zellen zu charakterisieren, um langfristig Therapien gegen diese zu entwickeln. Auf Grund unphysiologischer Wachstumseigenschaften eignen sich weder Zelllinien noch primäre Patientenzellen für die Isolierung ruhender ALL-Zellen, deswegen wurde das individualisierte ALL-Xenograftmodell in Kombination mit gentechnischer Manipulation der ALL-Zellen eingesetzt. Dazu wurden die primären Tumorzellen von drei Kindern mit ALL in immunsupprimierten Mäusen vermehrt und lentiviral transduziert, wodurch diese eine Luciferase, ein fluoreszierendes Protein und NGFR exprimierten. In zwei aufeinander folgenden Anreicherungsschritten wurden mit Hilfe der Transgene geringste Mengen der menschlichen Leukämiezellen aus dem Knochenmark der Mäuse isoliert. Unter Verwendung des Proliferationsmarkers CFSE wurde erstmals nachgewiesen, dass sich eine sehr kleine Subfraktion der ALL-Zellen über lange Zeit *in vivo* nicht teilt. Im Gegensatz zur Mehrheit der sich teilenden Zellen zeigten ruhende ALL-Zellen eine komplette Resistenz gegenüber systemischer Chemotherapie in der Maus. Retransplantationsversuche wiesen darauf hin, dass sowohl das fehlende Wachstum als auch die Chemoresistenz durch Faktoren der Knochenmarksnische bedingt wurden und keine zellautonomen Charakteristika darstellten.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass in der ALL eine Subfraktion von sich wenig teilenden Zellen existiert, die hochresistent gegen Chemotherapie *in vivo* ist. Die hier entwickelten Modelle können nun eingesetzt werden, um neue Therapien gegen ruhende ALL-Zellen zu entwickeln.

2. Abstract

Considering that the mortality rate in patients suffering from acute lymphoblastic leukemia (ALL) is as high as 50 % among adults and 10 % among children the urgent need of improvements in ALL treatments persists. Quiescent cells present a therapy-relevant subfraction of tumor cells, as they are capable of causing the persistence and relapse of the tumor. So far, studying resting ALL-cells was not feasible, as these cells could not be isolated.

The development of a new method to isolate resting ALL-cells for their characterization, so as to work towards improving ALL-therapy, was one objective of this thesis. Due to their unphysiological growth behavior neither cell lines nor primary patient cells are suitable for the isolation of resting cells. Hence the individualized ALL-xenograftmodel was combined with a genetic manipulation of the ALL-cells. The primary tumor cells of three children suffering from ALL were expanded in highly immunocompromised mice and transfected using a lentiviral transduction system, so as to express a luciferase, a fluorescent protein and NGFR. It became possible to isolate minute amounts of human leukemic cells from the mouse bone marrow by employing two of these transgenes allowed to employing two sequentially performed enrichment steps. Applying the proliferative marker CFSE enabled to detect a very small subfraction of longtime resting cells being present in ALL *in vivo* for the first time. In contrast to the majority of the dividing cells, the resting ALL-cells showed a complete resistance to systemic chemotherapy in mice. Retransplantation experiments led to the conclusion that not cell autonomous characteristics but rather factors of the bone marrow niche are responsible for the missing growth as well as the chemoresistance of those tumor cells.

This thesis evidences the presence of a subfraction of ALL-cells that undergoes few divisions and is resistant against chemo therapy *in vivo*. New therapies against resting cells can now be devised, building upon the models presented in this thesis.

3. Einleitung

Für den Erfolg einer Krebstherapie ist entscheidend, dass all diejenigen Tumorzellen im Körper des Patienten abgetötet werden, die einen Rückfall der Krankheit auslösen können. Eine besonders schwierig therapierbare Subpopulation stellen dabei Tumorzellen dar, die sich in einer Phase der Zellruhe befinden, da sie eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapie besitzen. Zellruhe ist eine Eigenschaft von adulten Stammzellen im normalen Gewebe. Eine Ursache für die proliferative Ruhe von Stammzellen in normalen Geweben stellen Interaktionen mit ihrem direkten Umfeld dar. Bei Zellruhe und Chemoresistenz handelt es sich um Eigenschaften, welche auch mit Krebsstammzellen in Verbindung gebracht werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine Subfraktion von ruhenden ALL-Zellen zu isolieren und zu charakterisieren mit dem langfristigen Ziel, innovative Therapiestrategien zur Eliminierung von ruhenden ALL-Zellen zu entwickeln.

3.1. Zellruhe und Resistenz gegenüber Chemotherapie

Die meisten konventionellen Chemotherapeutika sind vorwiegend für proliferierende Zellen toxisch. Zum Beispiel verhindern Vincaalkaloide, wie Vincristin, die Polymerisierung der Mikrotubuli. Dadurch arretieren sie sich teilende Zellen in der Mitose, da diese keinen Spindelapparat mehr aufbauen und somit die Chromosomen nicht auf die entstehenden Tochterzellen verteilen können, was letztlich zum Zelltod führt (Bensch und Malawista 1968). Topoisomerase-Inhibitoren, wie Etoposid oder Mitoxantron, wiederum verhindern, dass die während der S-Phase entstehenden DNA-Stränge entspiralisiert werden, wodurch es zu Strangbrüchen und somit ebenfalls zum Zelltod kommt (Minocha und Long 1984).

Weder die durch konventionelle Chemotherapeutika targetierten Topoisomerasen noch Mikrotubuli sind einzigartig in Krebszellen. Im Gegenteil: Jede sich teilende Zelle wird von der Chemotherapie beeinflusst. Zusätzlich kommt es selbst in sich nicht teilenden Zellen zu toxischen Effekten, da zum Beispiel die angesprochenen Mikrotubuli nicht nur für die Zellteilung von proliferierenden Zellen benötigt werden, sondern auch für den axonalen

Transport in Neuronen. Vincristin ist daher auch neurotoxisch (Rosenthal und Kaufman 1974, Legha 1986). Ebenso verhält es sich mit Topoisomerasen, welche auch für die DNA-Reparatur in sich nicht teilenden Zellen benötigt werden. Trotzdem werden auf Grund der Wirkmechanismen von Chemotherapeutika ruhende, normale Zellen vorwiegend verschont, was allerdings auch auf Krebszellen, sollten diese sich nicht teilen, zutrifft (Blagosklonny 2005).

Das Ziel einer Chemotherapie ist es, alle Krebszellen im Patienten restlos abzutöten, was nicht in allen Fällen gelingt. Reagieren die Krebszellen überhaupt auf die Therapie, verbleiben häufig noch Zellen nach Abschluss der Behandlung im Körper, wenn auch oft in sehr geringer Menge. In diesen Fällen spricht man von einer minimalen Resterkrankung (englisch „minimal residual disease, MRD“). Diese verbleibenden Zellen können dazu in der Lage sein, wieder zu expandieren und ein erneutes Wachstum des Tumors einzuleiten.

Ein Zustand der Zellruhe für die Dauer des Verlaufes der Therapie könnte eine mögliche Ursache dafür sein, dass Krebszellen eine Therapie überleben. Unterschiedliche Studien zeigen, dass sowohl normale Zellen als auch Krebszellen, wenn sie ruhen oder sich langsam teilen, weniger sensitiv gegenüber Chemotherapie sind, als sich schnell teilende Zellen. Im hämatopoetischen System enthalten normale, ruhende Stammzellen große Mengen des Zellruhe-Regulators $p21^{cip1/waf1}$ (p21). Behandelt man Mäuse, welche kein p21 produzieren, mit dem Chemotherapeutikum 5-Fluoruracil (5-FU), so weisen diese Tiere nach der Behandlung wesentlich weniger Stammzellen auf (10,8 %) als Wildtyp-Mäuse, welche auf die gleiche Weise therapiert wurden (60,5 %) (Cheng, Rodrigues et al. 2000). Gleiches wurde bei Tumorzellen beobachtet: Untersuchungen an einer Pankreas-Zelllinie haben gezeigt, dass die einzigen Zellen, welche eine Therapie mit 5-FU überleben, ruhende Zellen sind (Dembinski und Krauss 2009). Des Weiteren zeigte eine *in vivo*-Studie mit einer Brustkrebszelllinie, dass ruhende Tumorzellen durch eine Behandlung mit Doxorubicin nicht eliminiert werden konnten (Naumov, Townson et al. 2003). Diese Studien an ruhenden Stamm- und Tumorzellen zeigen, dass ein Zustand der Zellruhe vor Chemotherapeutika schützen kann.

3.2. Adulte Stammzellen, Zellruhe und LRCs

In Epithelgeweben wie dem Darm und der Haut werden ständig neue Zellen als Ersatz für jene generiert, welche an die Umgebung verloren gehen. Um die Bildung neuer Zellen zu gewährleisten sind einige Gewebe hierarchisch organisiert. Dabei stehen an der Basis dieser Hierarchie sich langsam teilende adulte Stammzellen, welche im Zuge einer asymmetrischen Teilung jeweils eine neue Stammzelle sowie eine sich schnell teilende Zelle hervorbringen (Watt und Jensen 2009). Letztere proliferiert schnell über eine limitierte Anzahl an Teilungen, wodurch neue Zellen entstehen, welche differenzieren und Funktionen im adulten Gewebe übernehmen. Adulte Stammzellen sind somit wichtig für die Homöostase von Geweben und für die Antwort auf Verletzungen der Epithelgewebe des Körpers. Sie werden dadurch charakterisiert, dass sie sich unendlich oft selbst erneuern und Abkömmlinge generieren können, welche differenzieren und gewebespezifische Zelltypen ausbilden können (Reya, Morrison et al. 2001). Bislang konnten adulte Stammzellen in den unterschiedlichsten Geweben des Körpers, wie der Haut (Cotsarelis, Sun et al. 1990), der Milchdrüse (Shackleton, Vaillant et al. 2006), dem Darm (Barker, van Es et al. 2007), der Prostata (Leong, Wang et al. 2008), dem Gehirn (Uchida, Buck et al. 2000) und dem hämatopoetischen System (Osawa, Hanada et al. 1996) entdeckt werden.

Eine allgemeine Eigenschaft von adulten Stammzellen ist die Zellruhe im Bezug auf den Zellzyklus. Die Zellruhe ist der direkte Gegensatz zur Proliferation: Es ist ein reversibler Zustand des sich nicht Teilens (Coller, Sang et al. 2006). Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Eigenschaft des langsamen Teilens oder der Zellruhe nicht für alle adulten Stammzellen zwangsweise notwendig ist (Jaks, Barker et al. 2008), wirkt sich ihr Verlust negativ auf die Langzeiterhaltung der Stammzellkapazität aus (Cheng, Rodrigues et al. 2000). Die Zellruhe bewahrt adulte Stammzellen davor, ihre proliferative Kapazität zu erschöpfen sowie sich zu differenzieren, und schützt vor der Anhäufung von Mutationen, welche durch regelmäßige DNA-Synthese entstehen können (Coller, Sang et al. 2006, Sang, Coller et al. 2008, Viatour, Somervaille et al. 2008).

Erste Versuche zur Identifizierung einer adulten Stammzellfraktion bedienten sich der Eigenschaft des langsamen Teilens. Entsprechende Experimente bauten darauf auf, die DNA von Zellen mit 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) oder anderen Markern zu färben. Teilende Zellen geben die Markierung an die Tochterzellen weiter, wodurch ihr BrdU-Signal „verdünnt“ wird. Sich langsam teilende Stammzellen behalten die Markierung über längere Zeit und können so durch ein relativ stärkeres Signal identifiziert werden. Diese Zellen werden als markierungsbehaltende Zellen (englisch „label-retaining cells (LRCs)“) bezeichnet. Erste Studien dieser Art wurden mit Stammzellen von Haarfollikeln durchgeführt (Cotsarelis, Sun et al. 1990). Dort konnte nachgewiesen werden, dass ruhende Zellen sich für die Dauer von bis zu einem Jahr nicht teilen (Christofidou-Solomidou, Liu et al. 1999). LRCs wurden ebenfalls im Darm entdeckt (Potten, Booth et al. 2003) und ruhende Zellen im Pankreas konnten nach ihrer Isolierung *in vitro* differenzieren (Duvill  , Attali et al. 2003), wodurch ihre Stammzeleigenschaften nachgewiesen wurden.

Die Stammzellen des hämatopoetischen Systems sind die sowohl phänotypisch als auch funktionell wohl am besten charakterisierten adulten Stammzellen. Hier konnte bei humanen Zellen nachgewiesen werden, dass LRCs existieren, welche im Gegensatz zu stark proliferierenden Zellen einen Vorteil bei der *in vitro* Koloniebildung aufweisen (Punzel und Ho 2001). In der murinen Hämatopoese konnte nachgewiesen werden, dass LRCs vorwiegend in der Fraktion von Zellen auftreten, welche stammzelltypische Oberflächenproteine exprimieren (Wilson, Laurenti et al. 2008). Wird den hämatopoetischen Stammzellen die Möglichkeit zur Ruhe entzogen, sind sie nicht dazu in der Lage, nach ihrer Transplantation ein h  matopoetisches System zu regenerieren (Cheng, Rodrigues et al. 2000).

In neueren Studien wurde zur Identifizierung von LRCs eine Markierung mit 5-(6)-Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester (CFSE) verwendet. Im Gegensatz zur Markierung mit BrdU, werden bei einer Markierung mit CFSE nicht die DNA, sondern alle Proteine einer Zelle unspezifisch markiert (Abbildung 1). Diese Markierung wird bei einer Teilung gleichermaßen an die entstehenden Tochterzellen weitergegeben, wodurch das Fluoreszenzsignal der entstehenden Tochterzellen halb so intensiv ist wie das Signal der Mutterzelle (Lyons und Parish 1994). Im Laufe mehrerer Teilungen wird das Signal immer schwächer.

Gegenüber den DNA-Markierungen weist eine Markierung mit CFSE den großen Vorteil auf, dass die zu analysierenden Zellen nicht permeabilisiert werden müssen, sondern direkt im lebenden Zustand analysiert werden können. Daher können nach einer Identifizierung von LRCs mittels CFSE funktionelle Analysen mit diesen Zellen durchgeführt werden. Im hämatopoetischen System von Mäusen wurde so eine Population von Stammzellen identifiziert, welche sich für die Dauer von bis zu 21 Wochen nicht teilte und nach ihrer Transplantation dazu in der Lage war, das gesamte hämatopoetische System einer Maus zu regenerieren (Takizawa, Regoes et al. 2011). Alle erwähnten Studien zeigen ein wichtiges Muster der Organisation von Geweben, in dem sich selten teilende Zellen vorkommen. Des Weiteren wird gezeigt, dass das seltene Teilen von Zellen mit einem Stammzellphänotyp einher geht.

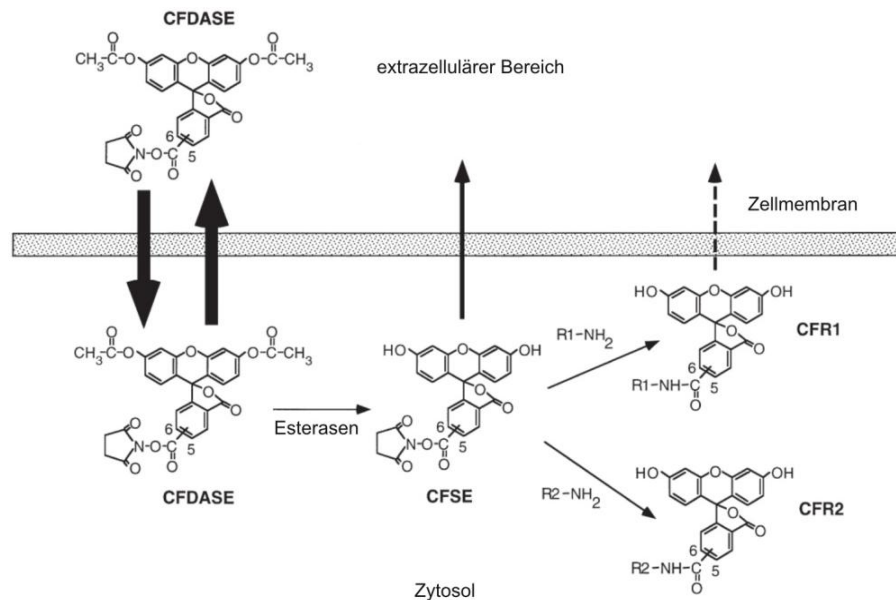


Abbildung 1: Schema der CFSE-Färbung (modifiziert nach Parish 1999)

Die membrangängige, nicht fluoreszierende Vorstufe von CFSE, 5-(6)-Carboxyfluorescein Diacetat-Succinimidyl Ester (CFDASE) wird von der Zelle aufgenommen und kann aus dieser auch wieder heraus diffundieren. Intrazelluläre Esterasen entfernen die beiden Acetatgruppen von CFDASE, wodurch fluoreszierendes CFSE entsteht, welches viel weniger membrangängig ist und daher nicht so schnell die Zelle verlässt wie CFDASE. Der Succinimidyl-Rest des CFSE ist sehr reaktiv gegenüber Aminogruppen und kann sich kovalent mit intrazellulären Molekülen verbinden. Einige dieser Verbindungen können weiterhin die Zelle verlassen oder werden schnell abgebaut. Es entstehen allerdings auch einige Bindungen mit langlebigen Molekülen, welche die Zelle nicht verlassen können und daher die Zelle stabil mit einem Fluoreszenzsignal markieren (Parish 1999).

3.3. Stammzellen und Stammzellnischen

Die erste Hypothese zur Stammzellnische wurde in den 1970er Jahren basierend auf Untersuchungen zum hämatopoetischen System erstellt (Schofield 1978). Diese Hypothese nimmt an, dass eine Assoziation von Stammzellen mit anderen Zellen, welche das Verhalten der Stammzelle bestimmen, besteht. Stammzellnischen bestehen aus Zellen, welche eine Mikroumgebung für Stammzellen bilden, diese versorgen und es ihnen ermöglichen, die Homöostase des Gewebes aufrecht zu erhalten (Spradling, Drummond-Barbosa et al. 2001). Außerdem bieten Nischenzellen ein schützendes Umfeld, welches Stammzellen von Differenzierungssignalen und Apoptosestimuli abschirmt (Li und Xie 2005). Die Erhaltung einer Balance zwischen Stammzellruhe und -aktivität ist ein Kennzeichen für eine funktionierende Nische (Yin und Li 2006).

Im blutbildenden System können die hämatopoetischen Stammzellen und ihre Abkömmlinge proximal an der endostalen Oberfläche von Trabeklen lokalisiert sein (Nilsson, Johnston et al. 2001). Für diese Lokalisierung werden Osteoblasten benötigt (Calvi, Adams et al. 2003, Zhang, Niu et al. 2003). Einige Studien zeigen, dass primäre und transformierte murine Osteoblastenzelllinien Zytokine produzieren, welche Stammzellfunktionen modulieren könnten (Hanazawa, Amano et al. 1987, Ralston 1994, Taichman und Emerson 1998). Bis jetzt konnte jedoch noch keine Kombination aus Faktoren gefunden werden, welche ein Überleben von hämatopoetischen Stammzellen *in vitro* gewährleistet, weshalb allein ein Cocktail aus segregierten Faktoren möglicherweise nicht ausreicht, um die Funktionen der Stammzellen zu erhalten, sondern direkte Zell-Zell-Interaktionen benötigt werden. *In vitro* verbinden sich hämatopoetische Stammzellen eng mit Osteoblasten (Crean, Meneski et al. 2004). Außerdem exprimieren Osteoblasten viele Zelladhäsionsmoleküle, welche möglicherweise für die Verbindung zwischen Osteoblasten und hämatopoetischen Stammzellen benötigt werden.

Oberflächenproteine, deren Funktion für die Interaktion zwischen Nische und Stammzelle bekannt sind, sind „Intercellular Adhesion Molecule 1-3“ (ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3), welche mit dem „Leukocyte Adhesion Glycoprotein“ (LFA-1) interagieren. LFA-1 wird auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert

(Möhle, Murea et al. 1995), welche über ICAM-1-3, exprimiert auf Osteoblasten, interagieren können. Es wird vermutet, dass die Interaktion über diese Oberflächenproteine für das Finden und das Lokalisieren von Stammzellen in der Nische verantwortlich ist.

Das „vascular cell adhesion protein 1“ (VCAM-1) ist eines der am besten charakterisierten Moleküle, welches bei der Interaktion zwischen Mesenchymzellen und hämatopoetischen Stammzellen eine Rolle spielt (Simmons, Zannettino et al. 1994). VCAM-1 wird auf Osteoblasten exprimiert (Tanaka, Morimoto et al. 1995) und sein Interaktionspartner VLA4 kann auf hämatopoetischen Progenitorzellen nachgewiesen werden (Möhle, Murea et al. 1995). Zudem wird VCAM-1 auf hämatopoetischen Zellen exprimiert und seine Expression ist in ruhenden Zellen höher als in mobilisierten Zellen (Ulyanova, Scott et al. 2005).

Ein weiteres Oberflächenprotein auf hämatopoetischen Stammzellen ist die Rezeptor-Tyrosinkinase Tie2 (Iwama, Hamaguchi et al. 1993). Tie2 wird auf adulten, hämatopoetischen Stammzellen benötigt, um sich in der Nische niederzulassen (Puri und Bernstein 2003). Angiopoietin-1 (Ang-1), der Ligand von Tie2, wird von Osteoblasten produziert. Die Interaktion von Tie2 auf hämatopoetischen Stammzellen mit seinem Liganden unterstützt die Fähigkeit zur Zellruhe (Arai, Hirao et al. 2004).

Im hämatopoetischen System sind also direkte Zell-Zell-Interaktionen zwischen hämatopoetischen Stammzellen und Osteoblasten bekannt, welche für die Lokalisierung der Stammzellen in der Nische verantwortlich sind und die in den Stammzellen eine proliferative Zellruhe einleiten (Abbildung 2).

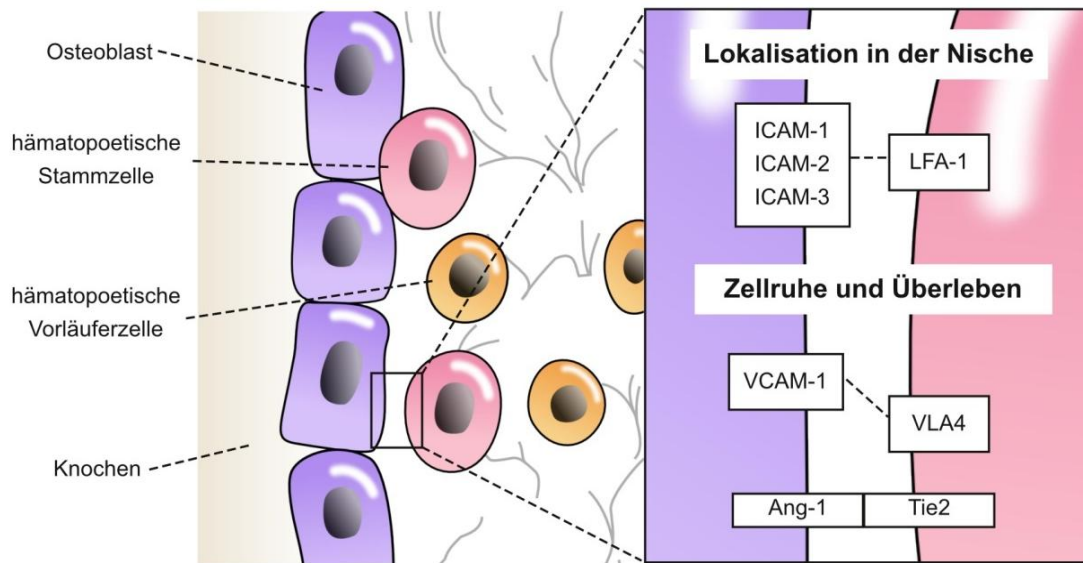


Abbildung 2: Hämatopoetische Stammzellnische

Basierend auf (Taichman und Emerson 1998) sowie (Moore und Lemischka 2006)

Hämatopoetische Stammzellen interagieren über Oberflächenproteine mit Osteoblasten, welche die hämatopoetische Stammzellnische bilden. Die Interaktion zwischen Stammzellen und Nische sorgt dafür, dass die Stammzellen in der Nische lokalisiert sind und dort nicht proliferieren.

3.4. Tumorinduzierende Zellen und das Krebsstammzell-Konzept

Es gibt immer mehr Beweise dafür, dass eine Subfraktion von Krebszellen, welche sich von der Masse des Tumors unterscheidet und für seine Langzeiterhaltung verantwortlich ist, in unterschiedlichen Krebstypen existiert (Dalerba, Cho et al. 2007, Almendro, Marusyk et al. 2013). Bei dieser Subfraktion handelt es sich um eine funktionell definierte Entität, welche Eigenschaften aufweist, die zur Definition von adulten Stammzellen verwendet werden. Trotzdem muss diese Subfraktion nicht zwangsweise aus adulten Stammzellen entstehen (Jordan 2007). Für die Nomenklatur dieser Fraktion gibt es unterschiedliche Ansätze: Auf Grund gemeinsamer Eigenschaften mit Stammzellen wird die Fraktion häufig als *Krebsstammzellen* bezeichnet, wodurch das gesamte Konzept des Auftretens einer funktionell gesonderten Subfraktion in Tumoren als *Krebsstammzell-Konzept* beschrieben wird. Diese Bezeichnung kann allerdings falsche Rückschlüsse auf Eigenschaften der Fraktion zulassen und ist daher unter Umständen irreführend. Häufig wird auch die weniger spekulative und mehr auf die Funktion der Zellen bezogene Bezeichnung *tumorinduzierende Zellen*, im Falle von Leukämien auch *leukämieinduzierende Zellen*, verwendet. Eindeutige Abgrenzungen zwischen beiden Bezeichnungen

sind in der Literatur nicht zu finden. Ein fließender Übergang von einer Bezeichnung in die andere ist dabei keine Seltenheit (Bansal und Banerjee 2009). Allerdings wird am häufigsten der Ausdruck Krebsstammzellen verwendet.

Krebsstammzellen, oder tumorinduzierende Zellen, werden als eine Zellfraktion des Tumors definiert, welche sich selbst erneuert, das Potential zur unlimitierten Proliferation hat und multipotent ist, wodurch sie die Heterogenität eines Tumors generieren können (Reya, Morrison et al. 2001). Zusammen mit einem Wechsel zwischen Zellruhe und Proliferation können diese Eigenschaften als die Primäreigenschaften der Subfraktion zusammengefasst werden. Als Sekundäreigenschaften können eine geringe Apoptosesensitivität und eine hohe Chemoresistenz, Kommunikation mit dem Mikroumfeld, sowie Migrationsfähigkeit und Engraftmentkapazität aufgeführt werden (Gires 2011). Eine Kombination aus diesen Primär- und Sekundäreigenschaften lässt die Annahme des Konzepts zu, dass Krebsstammzellen, welche eine Chemotherapie überleben, nach Abschluss der Therapie ein erneute Ausbildung des Tumors einleiten können (Abbildung 3).

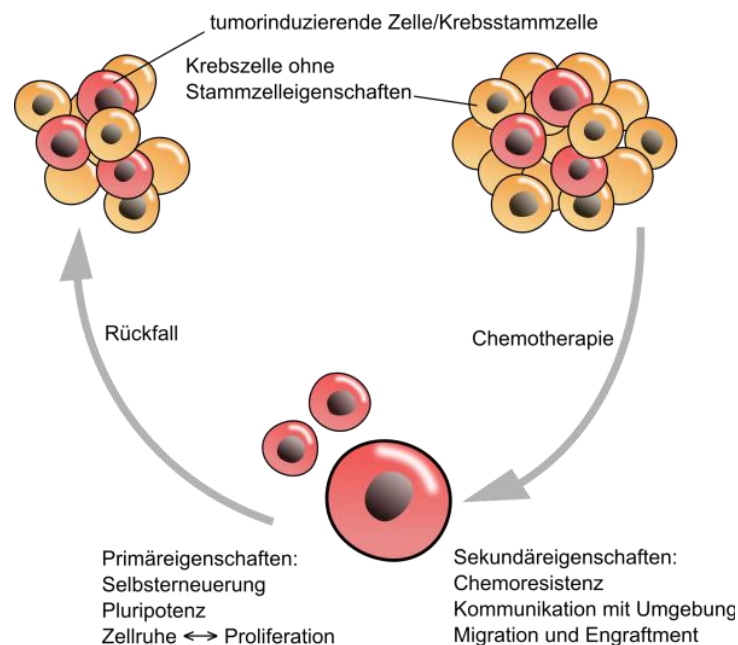


Abbildung 3: Tumorinduzierende Zellen

Basierend auf Wang 2007 und Gires 2011.

Konventionelle Chemotherapie reduziert die Anzahl der Krebszellen ohne Stammzeleigenschaften, aber tötet nicht die tumorinduzierenden Zellen, was zu einem erneuten Auswachsen des Tumors und einen Rückfall des Patienten führt.

Gemäß des Modells in Abbildung 3 ist das Eliminieren der tumorinduzierenden Zellen unablässig für die endgültige Entfernung des Tumors (Wang 2007).

Aktuelle Methoden zur Isolierung und Charakterisierung von tumorinduzierenden Zellen oder Krebsstammzellen basieren auf Zelloberflächenmarker, welche auf Zellpopulationen mit Stammzeleigenschaften angereichert sind. Diese Art der Anreicherung wurde zum ersten Mal von Bonnet und Dick im Jahr 1997 angewendet. Diese zeigten, dass nur Zellen, welche positiv für das Membranprotein CD34 und negativ für das Membranprotein CD38 sind, dazu in der Lage waren, eine humane akute myeloische Leukämie (AML) in einem immunkomprimierten Mausmodell zu generieren (Bonnet und Dick 1997). Seitdem wurden Krebsstammzell-Phänotypen in weiteren Krebstypen, wie zum Beispiel Brustkrebs (Al-Hajj, Wicha et al. 2003), Prostatakrebs (Collins, Berry et al. 2005) und Darmkrebs (O'Brien, Pollett et al. 2006) entdeckt. Als Nachweis der Stammzellpopulation wurde entweder die Fähigkeit zur Koloniebildung *in vitro* oder die Eigenschaft, nach einer Transplantation der Zellen in immunkomprimierten Mäusen einen Tumor hervorzurufen, angewendet.

Die Identifizierung von Krebsstammzellen über Oberflächenmarker wird allerdings auch kritisch betrachtet. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine Markierung mit einem CD38-Antikörper die Xenotransplantation von AML-Zellen beeinträchtigt (Taussig, Miraki-Moud et al. 2008). Des Weiteren wurde gezeigt, dass auch AML-Subfraktionen, welche nicht den Phänotyp CD34+/CD38- aufweisen, in immunkomprimierten Mäusen anwachsen können (Taussig, Vargaftig et al. 2010). Im Falle des Stammzellphänotyps von Darmkrebszellen wurden kontroverse Daten auf Grund der Verwendung von zwei unterschiedlichen anti-CD133-Antikörpern generiert (Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2006, Shmelkov, Butler et al. 2008, Kemper, Sprick et al. 2010).

Bisher konnte noch nicht für jede Tumorentität ein Stammzellphänotyp definiert werden. Analog zur AML wird angenommen, dass in der ALL ebenfalls eine seltene Unterfraktion von leukämieinduzierenden Zellen existiert. Der zur Identifizierung von tumorinduzierenden Zellen in der AML verwendete Phänotyp (CD34+/CD38-) trifft allerdings nicht auf Zellen der ALL zu (Kong, Yoshida et al. 2008). Auch eine Untersuchung bei der B-ALL-Zellen anhand der unterschiedlichen B-Zell-Reifemarker CD19, CD20 und CD34 sortiert wurden,

konnte keine Fraktion identifizieren, welche keine leukämieinduzierenden Zellen enthält (le Viseur, Hotfilder et al. 2008). Selbst B-ALL Zellen, welche für CD20, ein Marker für fortgeschrittene B-Zellreife, positiv waren, zeigen leukämieinduzierendes Potential (Rehe, Wilson et al. 2013). Möglicherweise sind B-ALL-Zellen dazu in der Lage, zwischen unterschiedlichen Reifegraden zu wechseln und somit auch ihren Oberflächenmarker-Phänotyp zu verändern. Diese Wandlung könnte sowohl in einem reiferen als auch in einem weniger reifen Phänotyp möglich sein (McClellan und Majeti 2013). Hierbei handelt es sich allerdings nur um eine Vermutung. Die oben erwähnten Studien zeigen jedoch, dass, falls es in der ALL eine Unterteilung in leukämieinduzierende Zellen und Zellen, die nicht dazu in der Lage sind, gibt, konnten diese bisher nicht durch die Verwendung von Oberflächenmarker voneinander unterschieden werden.

3.5. Wachstum von Leukämien und soliden Tumoren

Krebs ist im Essentiellen eine Krankheit aufgrund unkontrolliertem Zellwachstums. Im Gegensatz zu gesunden Zellen umgehen Krebszellen Signale des Zelltods und der Wachstumsinhibierung, wodurch sie wertvollen Raum im normalen Gewebe einnehmen und Nährstoffe verbrauchen. Dies führt dazu, dass Tumore die Funktion von gesunden Organen oder Systemen verhindern und dadurch den Patienten tödlichen Schaden zufügen können. Die Entwicklung von Krebs ist ein komplexer, schrittweiser Prozess bei dem Mutationen angehäuft werden, wodurch Zellen entstehen, welche die Kennzeichen von Krebs aufweisen: Umgehung von Apoptose, Fehlregulation des Energiehaushaltes, Umgehung des Immunsystems, genomische Instabilität, Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber Antiwachstumssignalen, invasive und metastasierende Eigenschaften, tumorförderliche Entzündung, unbegrenztes Replikationspotential und anhaltende Angiogenese (Hanahan und Weinberg 2011).

Kenntnisse über das Wachstum von Tumoren in Patienten sind wertvoll, um die Biologie der Krankheit besser zu verstehen und Vorsorgeuntersuchungen zu optimieren, aber auch um Vorhersagen über den Krankheitsverlauf treffen zu können oder die Abläufe von Chemotherapien besser abzustimmen (Norton 1988, Bassukas, Hofmockel et al. 1996). Da ein Patient, sobald bei ihm Krebs

diagnostiziert wurde, schnellstmöglich behandelt werden muss, kann das Wachstum der Krankheit nach ihrer Entdeckung nicht ohne verändernde Einflüsse wie Chemotherapie weiter verfolgt werden. Zudem ist eine genaue Ermittlung der Krebszellzahl im Patienten kaum möglich. Es gibt daher nur wenige Studien zum Wachstum von Krebs, welche auf gemessenen Patientendaten beruhen (Afenya 2001). Messungen in frühen Stadien der Krankheitsentwicklung oder sogar direkt nach ihrer Entstehung liegen selten vor, da der Patient zu diesen Zeitpunkten noch beschwerdefrei ist und sich daher nicht in medizinischer Betreuung befindet.

Aus den oben genannten Gründen ist die Verwendung von Xenograft-Tiermodellen zur Analyse des Wachstums von humanen Krebszellen naheliegend. Xenograftmodelle erlauben es, das Wachstum von primären humanen Zellen in einer immunkomprimierten Maus zu beobachten. Im besten Fall generieren die transplantierten Tumorzellen eine Krankheit in der Maus, welche der Krankheit im Menschen sehr ähnlich ist (Francia, Cruz-Munoz et al. 2011). Im Fall von soliden Tumoren werden Untersuchungen an subkutan xenotransplantierten Tumorzellen häufig durchgeführt, um die Wirksamkeit von Medikamenten zu überprüfen. Dabei kann der Durchmesser des Tumors durch die Haut des Tieres gemessen werden, woraus das Tumolvolumen errechnet werden kann (Tomayko und Reynolds 1989, Corbett, Polin et al. 2004, Ehrhardt, Schrembs et al. 2011). Im Gegenzug zu soliden Tumoren generieren Tumorzellen von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) in der Maus eine Krankheit, deren Verteilung auf die Organe der Verteilung im Menschen sehr ähnlich ist (Liem, Papa et al. 2004). Daher kann bei solchen systemisch wachsenden Leukämien die Bestimmung der Tumorlast im Tier nicht wie bei subkutanen Tumoren erfolgen. In diesen Modellen wird die Entwicklung der Krankheit durch die Messung der undifferenzierten Vorläuferzellen (Blasten) im peripheren Blut bestimmt. Diese Messung kann eine Aussage über die Anzahl der fluktuierenden Zellen geben, jedoch nicht über die genaue Anzahl von Blasten in Organen wie Leber, Milz oder Knochenmark. Um das Wachstum von Leukämien in einem gesamten Tier zu verfolgen, können *in vivo*-Bildgebungsverfahren angewendet werden (Lyons 2005, O'Neill, Lyons et al. 2010, Terziyska, Alves et al. 2012). Bei diesen Verfahren werden von den Xenograftzellen emittierte Lichtsignale detektiert. Diese stehen jedoch in keinem

direkten Zusammenhang mit der absoluten Anzahl der Xenograftzellen in einzelnen Organen der Tiere. Des Weiteren sind *in vivo*-Bildgebungsverfahren oft nicht sensitiv genug, um das Wachstum der Krankheit in frühen Stadien zu verfolgen.

Um das Wachstum von Tumoren zu beschreiben und zu prognostizieren, werden mathematische Modelle verwendet. Die beiden am häufigsten angewendeten Typen von Wachstumsmodellen sind exponentielle Modelle sowie Modelle für ein limitiertes Wachstum, wie das Gompertz` Modell (Liedo, Orozco et al. 1992, Mehrara, Forssell-Aronsson et al. 2013) oder das logistische Wachstumsmodell (Spratt, von Fournier et al. 1993, Atuegwu, Arlinghaus et al. 2013), welche beide eng miteinander verwandt sind. Exponentielle Modelle gehen davon aus, dass sich die Tumorzellen ungehindert und unbegrenzt teilen, bis der Organismus kollabiert. Studien haben jedoch gezeigt, dass das Tumorwachstum im Laufe der Zeit auch nachlassen kann (Hart, Shochat et al. 1998, Afenya und Calderón 2000), weshalb auch häufig begrenzte Modelle verwendet werden, um das Wachstum von Tumoren zu beschreiben.

Um zu bestimmen, welches Modell dem Wachstum des untersuchten Tumors am besten entspricht, werden die Wachstumskurven der Modelle mit gemessenen Werten überlagert. Dabei werden zum Überlagern für das exponentielle Modell zwei, für begrenzte Modelle jedoch drei Messwerte benötigt. Da in klinischen Studien bald nach der Diagnose mit der Therapie begonnen wird und das natürliche Wachstumsverhalten des Tumors daher nur eine begrenzte Zeit lang verfolgt werden kann, kann häufig nur ein exponentielles Modell und keines, welches eine Wachstumsabnahme zugrunde legt, für die Überlagerung mit den Messdaten angewendet werden (Haeno, Gonen et al. 2012).

Zusammenfassend stellt es ein vielversprechendes Ziel dar, Therapien gegen ruhende Tumorzellen zu entwickeln. Neben ihrer schweren Therapierbarkeit durch konventionelle Chemotherapie könnten sie auch für tumorinduzierende Zellen angereichert sein. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, eine Fraktion von ruhenden Zellen in der ALL zu isolieren und zu charakterisieren.

3.6. Zielsetzung dieser Arbeit

Immer noch versterben etwa 50 % der Erwachsenen und mehr als 10 % der Kinder mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) an ihrer Tumorerkrankung. Neue Möglichkeiten der Therapie der ALL sind dringend notwendig.

Besonders schwierig therapierbar sind ruhende ALL-Zellen, da sie eine besonders starke Resistenz gegen Chemotherapie aufweisen könnten. Ruhende Zellen stellen auch deswegen eine besonders therapierelevante Subfraktion von Tumorzellen dar, weil sie Krankheitspersistenz und -rückfall induzieren können. Deswegen ist es wünschenswert, die Subpopulation der ruhenden ALL-Zellen genau untersuchen zu können, um Therapieansätze zu entwickeln, die ruhende ALL-Zellen effektiv eliminieren. Bis heute ist es jedoch nicht zufriedenstellend möglich, ruhende ALL-Zellen genau zu untersuchen, da sowohl etablierte ALL-Zelllinien, als auch primäre Tumorzellen von Patienten mit ALL das heterogene physiologische Wachstum der ALL schlecht abbilden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, ruhende Tumorzellen zu isolieren und anzureichern und mit einer ersten Charakterisierung dieser Zellen zu beginnen.

Zur Erlangung dieses Zieles wurden die primären Tumorzellen einzelner Patienten mit ALL in schwer immunsupprimierte Mäuse transplantiert, molekular markiert und mit Hilfe der Marker aus dem Knochenmark der Tiere isoliert. Die zusätzliche Färbung der Zellen mit CFSE erlaubte die Identifikation und Isolierung von ruhenden ALL-Zellen. Erste Untersuchungen wiesen auf eine wichtige Rolle der Knochenmarknische für Wachstumsverhalten und Chemoresistenz ruhender ALL-Zellen hin.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Geräte und Software

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Beschreibung
<i>Brutschrank</i>	B 6060 für Bakterienkultur (Heraeus, Hanau, D)
<i>Durchflusszytometer</i>	BD LSRFortessa (BD Bioscience, Heidelberg, D)
<i>Zellsortiergerät</i>	BD FACSAriaIII (BD Bioscience, Heidelberg, D)
<i>Inkubator</i>	Hera Cell (Heraeus, Hanau, D)
<i>Inverses Mikroskop</i>	Carl Zeiss 550 1317 (Zeiss, Jena, D)
<i>Fluoreszenzmikroskop</i>	Carl Zeiss Axioplan XYZ (Zeiss, Jena, D)
<i>Sterilbank</i>	HeraSafe HS12 und HS18 (Heraeus, Hanau, D)
<i>Feststoffwaage</i>	440-43N (Kern&Sohn, Balingen, D)
<i>Feinwaage</i>	Sartorius 2001 MP2 (Sartorius AG, Göttingen, D)
<i>Wasserbaderhitzer</i>	WB14 mit Schrägdeckel (Memmert, Schwabach, D)
<i>Tischzentrifuge</i>	5417C und 5417R (Eppendorf)
<i>Zellkultur</i>	Rotanta 4810 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D)
<i>PCR-Maschine</i>	Primus 25 advanced Thermocycler (PeqLab, Erlangen, D)
<i>Geldokumentation</i>	E-BOX VX5 (Vilbert Lourmat, Eberhardzell, D)
<i>Photometer</i>	Nanodrop (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)
<i>In vivo Bildgebung</i>	IVIS Lumina II Imaging System (Caliper Life Sciences, Mainz, D)

Tabelle 2: Verwendete Software

Verwendung	Software
<i>in silico</i> Klonierungen	Clone Manager 7
Durchflusszytometrische Analysen	FlowJo vX.0.6
Statistische Analysen	GraphPad Prism v6.02
Bildbearbeitung	Photoshop CS3
Auswertung von Daten der in vivo-Bildgebung	Living Image software 4.x

4.2. Medien und Lösungen

4.2.1. Reagenzien der Bakterien- und Zellkultur

Medien, Zusätze und Puffer

<i>Ampicillin-Lösung</i>	25 mg/ml in H ₂ O, steril filtriert (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
<i>α-Thioglycerol</i>	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
<i>BrdU</i>	VWR, Radnor, PA, USA
<i>DMEM</i>	Kulturmedium (Gibco, San Diego, CA, USA)
<i>FCS</i>	Pan Biotech, Aidenbach, D
<i>HBG-Puffer</i>	1,5 % Glucose (w/v), mit HEPES auf pH 7,1 eingestellt
<i>ITS-G (100x)</i>	Insulin-Transferrin-Selenium (Gibco, San Diego, CA, USA)
<i>LB-Medium</i>	10 g Trypton/Pepton, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl ad 1 l H ₂ O, evtl. mit 1 ml Ampicillin (25 mg/ml)
<i>LB-Agarplatten</i>	15 g Agar ad 1 l LB-Medium, anschließend autoklavieren, 800 µl Ampicillin-Stammlösung wurde unmittelbar vor dem Gießen zugegeben.
<i>Natrium-Pyruvat</i>	100 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
<i>Patientenmedium</i>	RPMI-1640, 20% FCS, 2 mM Glutamin, 1 % Penicillin-Streptomycin, 1 % Gentamycin
<i>Patientenmedium+</i>	RPMI-1640, 20% FCS, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 6 mg/l Insulin, 3 mg/l Transferin, 4 µg/l Selen, 50 µM α-Thioglycerol, 1 % Penicillin-Streptomycin, 1 % Gentamycin
<i>PBS (1x)</i>	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,42 g Na ₂ HPO ₄ , ad 1 l H ₂ O
<i>Pen/Strep</i>	Penicillin-Streptomycin 5000 U/ml (Gibco, San Diego, CA, USA)

<i>RPMI-1640</i>	Kulturmedium mit 5 mM Glutamin (Gibco, San Diego, CA, USA)
<i>TAE-Puffer</i>	10,8 g TRIS Base, 1,14 ml reine Essigsäure, 0,7 g EDTA, ad 1 l H ₂ O
<i>TE-Puffer</i>	1 mM EDTA, 10 mM Tris, auf pH 8,0 mit HCl eingestellt
<i>Trypsin (1x)</i>	0,5% Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe, D)
<i>TfB I</i>	2,418 g 100 mM RbCl, 1,98 g 50 mM MnCl ₂ , 0,294 g 10 mM CaCl ₂ , 0,588 g 30 mM Kaliumacetat, 30 g 15% (w/v) Glycerin, pH 5,8 wurde mit Essigsäure (0,2 M) eingestellt und steril filtriert.
<i>TfB II</i>	0,418 g 10 mM MOPS, 0,242 g 10 mM RbCl, 2,2 g 75 mM CaCl ₂ , 30 g 15% Glycerin

Andere Stimulanzien und Lösungen

<i>6xDNA-Ladepuffer</i>	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Amsacrin-Lsg.</i>	4 mg/ml in Ethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
<i>Daunorubicin-Lsg.</i>	1 mg/ml in 1x PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
<i>DAPI-Lsg.</i>	1 mg/ml in H ₂ O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
<i>Doxorubicin-Lsg.</i>	1 mg/ml in Ethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
<i>DMSO</i>	geeignet für Zellkultur (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
<i>dNTPs</i>	10 µM, in H ₂ O verdünnt von je 100 µM dATP, dTTP, dGTP und dCTP Stocklösungen (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)
<i>Größenmarker</i>	100 bp DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)
<i>Epirubicin-Lsg.</i>	1 mg/ml in H ₂ O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
<i>Etoposid-Lsg.</i>	1 mM in 1x PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

<i>Ethidiumbromid</i>	1 %ige Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, D)
<i>Ficoll</i>	(GE Healthcare, Freiburg, D)
<i>Mitoxantron-Lsg.</i>	0,1 mg/ml in Ethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
<i>Polybren</i>	2 mg/ml in H ₂ O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
<i>PI-Lsg.</i>	1 mg/ml in H ₂ O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
<i>Turbofect</i>	(Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)
<i>Vincristin-Lsg.</i>	20 mg/ml in H ₂ O (Merck, Darmstadt, Deutschland)
<i>Coelenterazin</i>	(Synchem OHG, Felsberg/Altenburg, Germany)

4.2.2. Plasmide

Tabelle 3: Plasmide

Plasmid	Ursprung	Größe (bp)
pRSV-Rev (392)	Addgene, Cambridge, MA, USA	4174
pMDLg/pRRE (393)	Addgene, Cambridge, MA, USA	8895
pMD2.G	Addgene, Cambridge, MA, USA	5824
pCDH-EF1-extGluc-T2A-mKate-T2A-NGFR	diese Arbeit	8887
pCDH-EF1-extGluc-T2A-mCherry	diese Arbeit	7993
pCDH-EF1-extGluc-T2A-NGFR	(Terziyska, Alves et al. 2012)	8125
pCDH-EF1-extGluc-copGFP	AG Apoptose, AGV	8053

4.2.3. Primer

Tabelle 4: Primer

Nummer	Sequenz	Tm (°C)
196	CCAAGCTGTGACCGGCGC	62,8
197	CACAAATTTTGTAATCCAGAGGTTG	58,1
214	GGAAGGGCCGGGATTCTC	60,5
259	GGCGAGGCGATCGTGGACATTCCTGAGAT	78,8
260	ATCTCAGGAATGTCCACGATCGCCTCGCC	78,8
262	ATGCATATGGGGGCAGGTGCCAC	66,8
263	GTCGACTTAGATTTCAGCTTCAGTTCCACC	63,9

4.2.4. Enzyme

Tabelle 5: Enzyme

Name	Verwendung	Hersteller
GoTaq	Kolonie-PCR	Promega, Madison, WI, USA
Pfu Polymerase	PCR	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
T4 DNA Ligase	Ligation	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
<i>EcoRI</i>	Restriktionsverdau	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
<i>BamHI</i>	Restriktionsverdau	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
<i>SalI</i>	Restriktionsverdau	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
<i>NsiI</i>	Restriktionsverdau	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
<i>XmnI</i>	Restriktionsverdau	Promega, Madison, WI, USA
<i>BglII</i>	Restriktionsverdau	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

4.2.5. Antikörper

Tabelle 6: Antikörper

Name	Herkunft	Hersteller
FITC anti-human CD271 (ME20.4)	Maus	Biologend, San Diego, CA, USA
PerCP-Cy5.5 anti-human CD271 (ME20.4)	Maus	Biologend, San Diego, CA, USA
anti-human NGFR MicroBeads		Miltenyi Biotect, Bergisch Gladbach, D
APC-Cy7 anti-mCD45 (30-F11)	Ratte	Biologend, San Diego, CA, USA
APC anti-BrdU (3D4)	Ratte	BD Bioscience, Heidelberg, D
PE anti-Annexin V		BD Bioscience, Heidelberg, D

4.2.6. Kommerzielle Reagenziensätze

Tabelle 7: Reagenziensätze

Name	Verwendung	Hersteller
Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit	Nachweis apoptotischer Zellen	BD Bioscience, Heidelberg, D
BrdU Flow Kit	Einbau und Nachweis von BrdU	BD Bioscience, Heidelberg, D
Qiagen Plasmid Mini Kit	Isolierung von Plasmid-DNA	Qiagen, Venlo, NL
Qiagen Plasmid Midi Kit	Isolierung von Plasmid-DNA	Qiagen, Venlo, NL
QIAquick PCR Purification Kit	Reinigung von PCR-Produkten	Qiagen, Venlo, NL
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Gezielte Mutagenese einzelner Basenpaare in Plasmid-DNA	Agilent Technologies, Oberhaching, D

4.3. Molekularbiologische und gentechnische Methoden

4.3.1. Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation des NGFR-Genes mit Überhängen für den Restriktionsverdau mit *Nsi*I und *Sa*I wurde die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: „polymerase chain reaction; PCR“) angewendet. Dazu wurde die Pfu-Polymerase verwendet, da sie, im Gegensatz zur GoTaq-Polymerase, eine „proof-reading“-Aktivität aufweist, wodurch die Anzahl von fehlerhaften Amplifikaten minimiert wird.

Der PCR-Ansatz enthielt:

77 µl H₂O

10 µl Pfu-Puffer MgSO₄

8 µl dNTPs

je 1 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (Primer 263 und Primer 262)

2 µl DNA-Template (Plasmid 2)

2 µl Pfu-Polymerase

Die Durchführung der PCR erfolgte nach dem folgenden Temperaturschema in einer PCR-Maschine:

45 s, 96°C → (45 s, 96 °C → 45 s, 59 °C → 45 s, 72 °C)x40 → 10 min 72 °C

Die entstandenen PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert oder unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen aufgereinigt.

4.3.2. Kolonie-PCR

Als Templates für die Kolonie-PCR wurde eine Bakterienkolonie in 25 µl TE-Puffer überführt und 5 min bei 97 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (10000 g/1 min). 2 µl wurden als Template für die PCR verwendet.

Beispielansatz (ausreichend für die Analyse von 25 Proben):

6,8 µl H₂O
2 µl GoTaq-Puffer
0,8 µl dNTPs
je 0,1 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer
0,1 µl GoTaq Polymerase
2 µl Template

Die Durchführung der PCR erfolgte nach dem folgenden Temperaturschema in einer PCR-Maschine:

2 min, 94°C → (1 min, 94 °C → 1 min, 55 °C → 2,5 min, 72 °C)x30 → 10 min, 72 °C

Die entstandenen PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

4.3.3. Enzymatische Hydrolyse von Nukleinsäuren

Die enzymatische Hydrolyse von Nukleinsäuren im Inneren eines DNA-Moleküls wird durch Endonukleasen, auch als Restriktionsenzyme bezeichnet, katalysiert. Es wurden zwei verschiedene Arten von Restriktionsansätzen verwendet: zum einen analytische Ansätze, bei denen die entstandenen Fragmente detektiert wurden, um das geschnittene DNA-Molekül zu analysieren. Zum anderen wurden präparative Ansätze verwendet, bei denen ein entstandenes Fragment für eine weitere Bearbeitung benötigt wurde. Ein Restriktionsansatz setzt sich aus einem passenden Puffer für die zu verwendenden Restriktionsenzyme, DNA-Lösung, Restriktionsenzym (in Glycerin gelöst) und H₂O zusammen. Von jeder verwendeten Restriktionsenzymlösung wurden etwa 5 % des gesamten Ansatzvolumens zugegeben. Bei den Puffern für die Enzyme handelte es sich immer um 10x Stammlösungen, daher machten diese 10 % des Ansatzvolumens aus. Die Menge der zugegebenen DNA-Lösung war abhängig von ihrer Konzentration. Bei einem analytischen Ansatz wurde sie so gewählt, dass im

Ansatz 8 ng – 20 ng DNA und bei einem präparativen Ansatz 200 ng – 500 ng DNA vorhanden waren. Der verbleibende Anteil des Ansatzes bestand aus H₂O.

analytischer Beispielansatz:

- 2 µl DNA-Lösung
- 5,5 µl H₂O
- 1 µl Puffer
- 0,5 µl Restriktionsenzym

4.3.4. Mutation einzelner Basenpaare

Um einzelne Basenpaare in einem Plasmid zu verändern, wurde das QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Agilent Technologies verwendet.

4.3.5. Ligation von Nukleinsäuren

Zur kovalenten Verknüpfung linearisierter Plasmid-DNA mit einem doppelsträngigen Oligonukleotid dienen Ligationsansätze mit T4 DNA Ligase. Das Verhältnis von Vektor zu Insert betrug 1:1 bis 1:3. Die Ansätze wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die ligierte DNA wurde anschließend direkt weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

Beispielansatz:

- Entsprechende Mengen von Vektor- und Insertlösung
- 1,5 µl Ligase Puffer 10x
- 1,5 µl T4 DNA Ligase
- ad 15 µl H₂O

4.3.6. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Molekülen anhand ihrer Größe wurden 1 % Agarosegele verwendet. Zu ihrer Herstellung wurden 1 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt und mit 2 µl Ethidiumbromid-Lösung versetzt. 10 µl einer zu untersuchenden DNA-Suspension wurden mit 2 µl 6x

DNA-Ladepuffer gemischt und in TAE-Puffer bis zu einer Stunde bei 80 V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht analysiert. Um DNA aus einem Gel zu isolieren, wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und nach Anleitung des QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt.

4.3.7. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Für eine Isolierung von kleineren Plasmid-DNA-Mengen (Mini-Isolierung) wurde eine 3-5 ml Übernachtskultur in LB-Medium mit Ampicillin angeimpft. Am folgenden Tag wurde die Kultur durch Zentrifugation (6000 g, 4 °C, 10 min) pelletiert, der Überstand verworfen und die Plasmid-DNA nach der Anleitung des Qiagen Plasmid Mini Kit aus dem Pellet isoliert. Zur Isolierung größerer Plasmid-DNA-Mengen (Midi-Isolierung) wurde eine 50 ml Übernachtskultur in LB-Medium mit Ampicillin mit 0,5-1 ml einer Vorkultur angeimpft. Am Folgetag wurde die Kultur zentrifugiert (6000 g, 4 °C, 10 min) und die Plasmid-DNA nach der Anleitung des Qiagen Plasmid Midi Kit aus dem Pellet isoliert.

4.3.8. Mengenbestimmung von DNA und Sequenzanalyse

Um die Konzentration einer DNA-Lösung zu bestimmen, wurden 2 µl der zu untersuchenden Lösung in einem Nanodrop-Photometer analysiert. Als Referenzwert wurde die Flüssigkeit gewählt, in der die DNA gelöst war. Die Messung wurde dreimal durchgeführt und anschließend der Mittelwert gebildet. Zur Sequenzanalyse wurde 1 µg der zu analysierenden DNA-Lösung zusammen mit einem passenden Primer an die Firma Eurofin MWG Biotech (Ebersberg, D) geschickt, welche die Sequenzierung mit speziellen „short hairpin“ neutralisierenden Agenzien durchführte. Um Abweichungen, wie eine Punktmutation, von der *in silico* synthetisierten Sequenz zu ermitteln, wurden Nukleotidsequenzen mit dem Logarithmus „blast“ verglichen.

4.4. Mikrobiologische Methoden

4.4.1. Kultivieren von *E. coli* DH5α

Die *E. coli* DH5α-Zellen wurden bei 37 °C kultiviert. Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden Glycerin-Dauerkulturen hergestellt. Dazu wurden 100 µl autoklaviertes Glycerin in 2 ml Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss zu 1,5 ml einer Bakteriensuspension zugegeben, gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Glycerin-Dauerkulturen wurden bei -20 °C gelagert.

4.4.2. Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen nach der Mehr-Ionen-Methode

Zur Herstellung von kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen wurde die Mehr-Ionen-Methode verwendet. Hierzu wurden 300 ml LB-Medium mit 3 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5α beimpft. Das Wachstum wurde durch photometrische Messungen bei 600 nm verfolgt. Sobald der A600-Wert 0,4 überstieg, wurden die Zellen für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (6000 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, die Pellets in insgesamt 90 ml eiskaltem Tfb I-Puffer gelöst und für 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (6000 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde wiederum verworfen, die Pellets insgesamt in 9 ml eiskaltem Tfb II-Puffer gelöst, vereinigt und für 15 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde möglichst schnell zu je 100 µl auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

4.4.3. Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E.coli*-Zellen

Die Transformation erfolgte durch Zugabe von 100 µl eines Aliquots von kompetenten *E. coli* DH5α -Zellen zu der entsprechenden DNA (Plasmid-DNA: 20 – 200 ng) und der sich anschließenden Inkubation auf Eis für eine Stunde. Anschließend wurden für 2 min ein Hitzeschock bei 42 °C und eine erneute Inkubation auf Eis für 5 min durchgeführt. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Zellen bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (6000 g, 3 min, RT), der Überstand verworfen, die

Zellen in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agar-Platten mit Apicillin ausplattiert.

4.5. Zellbiologische Methoden

4.5.1. Kultivieren, Einfrieren und Auftauen von humanen Zellen

Für die Produktion von Lentiviren zur Transduktion von ALL-Xenograftzellen wurde die adhärente Zelllinie HEK-293T verwendet. Die Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS kultiviert und alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:5 ausgedünnt. Dazu wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-Lösung für 7 min inkubiert und anschließend durch Zugabe von frischem DMEM mit 10 % FCS vom Plattenboden gelöst. Um die Zellen dauerhaft zu konservieren, wurde der halbe Inhalt einer voll bewachsenen 75 cm²-Kulturflasche in 1 ml FCS mit 10 % DMSO bei -80 °C in einem Plastikgefäß mit Innengewinde eingefroren und dauerhaft bei -196 °C gelagert.

Zum Auftauen wurde ein Plastikgefäß mit den aufzutauenden Zellen für 1 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und der Inhalt anschließend in 9 ml DMEM mit 10 % FCS überführt. Darauf wurde zentrifugiert (400 g, 5 min, RT) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml DMEM mit 10 % FCS gelöst und in eine frische Kulturflasche überführt.

Um ALL-Xenograftzellen außerhalb der Maus für kurze Zeit zu kultivieren, wurden diese in einer Konzentration von 1 Million Zellen in 1 ml Patientenmedium+ für bis zu 72 Stunden kultiviert. Zur Lagerung der ALL-Xenograftzellen wurden diese in Konzentrationen von 10 Millionen bis 100 Millionen Zellen pro Milliliter in FCS mit 10 % DMSO bei -80 °C in einem Plastikgefäß mit Innengewinde eingefroren und dauerhaft bei -196 °C gelagert. Zur Injektion von eingefrorenen Zellen in Mäuse wurde der Inhalt eines Plastikgefäßes bei 37 °C aufgetaut, einmal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend injiziert.

4.5.2. Stimulation mit zytotoxischen Agenzien

Um die zytotoxischen Effekte von Chemotherapeutika auf ALL-Xenograftzellen *in vitro* zu analysieren, wurden die Zellen direkt nach ihrer Isolierung aus der Maus zu einer Konzentration bis zu 100.000 Zellen in 100 µl Patientenmedium+ in den Kavitäten einer 96-Well-Platte ausgebracht. Die Spontanapoptose der Zellsuspension wurde sofort im Durchflusszytometer ermittelt. Anschließend wurden zu je drei Kavitäten Verdünnungen der Stammlösungen der zu analysierenden Zytostatika zugegeben. Alle 24 Stunden wurde die spontane Apoptose einer nicht mit Zytostatika stimulierten Kontrolle ermittelt. Sobald die spontane Apoptose von einem Messwert zum nächsten mehr als 30 % zunahm oder 50 % insgesamt überstieg, spätestens aber nach 72 h, wurde der Apoptosewert in allen Kavitäten der Platte bestimmt und der Versuch ausgewertet. Zur Bestimmung der spezifischen Apoptose wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{spezifische Apoptose} = \left(\frac{\text{Apoptose (stimuliert)} - \text{Apoptose (Kontrolle)}}{100 - \text{Apoptose (Kontrolle)}} \right) \cdot 100$$

4.5.3. Virusproduktion in HEK-293T-Zellen

Um humane Zellen stabil zu transduzieren, wurde ein lentivirales Transduktionssystem der dritten Generation verwendet (Dull, Zufferey et al. 1998, Zufferey, Donello et al. 1999). Zur Produktion von Lentiviren wurden HEK-293T-Zellen verwendet, welche in einer 75 cm² Zellkulturflasche in DMEM mit 10 % FCS und Pyruvat ausgesät wurden. Sobald die Zellen zu 50-80 % konfluent waren, wurden sie mit den Verpackungsplasmiden 392 (2,5 µg), 393 (5 µg) und pMD2.G (1,25 µg), sowie dem gewünschten Transfervektor (2,5 µg) transfiziert. Dazu wurden die benötigten Mengen der jeweiligen DNA-Suspensionen und 24 µl Turbofect (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) mit DMEM ohne FCS zu einem Endvolumen von 1 ml mit einander vermengt und gut gemischt. Anschließend wurde die Lösung für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium der HEK-293T-Zellen gewechselt und die Transfektionslösung tropfenweise in die Zellkulturflasche gegeben. Anschließend wurden die HEK-293T-Zellen 70 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Inhalt der Kulturflasche wurde in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und

zentrifugiert (400 g, 5 min, RT). Der Überstand wurde anschließend gefiltert und zur Konzentration der Viren auf ein Amicon-Ultra-15-Reaktionsgefäß (Merck Milipore, Darmstadt) geladen. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend zentrifugiert (2000 g, 30 min, RT) bis lediglich 200 bis 250 µl Konzentrat in der oberen Kammer des Gefäßes verblieben. Das Konzentrat wurde zu Aliquots von 1 bis 10 µl bei -80 °C gelagert.

4.5.4. Bestimmung des Virustiters

Der Virustiter von produzierten Viruskonzentraten (4.5.3) wurde bestimmt, indem $0,4 \times 10^6$ HEK-293T-Zellen in 2 ml DMEM mit 10 % FCS in den Kavitäten einer 6-well-Pallte ausgesät wurden. Am folgenden Tag wurden die ausgesäten Zellen mit unterschiedlichen Verdünnungen des Virenkonzentrats transduziert. Dazu wurde das Konzentrat zunächst 1:1000 in DMEM mit 8 µg/ml Polybren verdünnt. Von dieser Lösung ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe über 1:5, 1:10 und 1:30 hergestellt. Der Überstand, der am Vortag ausgesäten HEK-293T-Zellen, wurde entfernt und durch je 1 ml der unterschiedlichen Stufen der Verdünnungsreihe ersetzt. Als Kontrolle diente DMEM mit 8 µg/ml Polybren ohne Virenkonzentrat. 24 Stunden nach der Infektion wurde der Überstand der HEK-293T-Zellen erneut entfernt und durch frisches DMEM mit 10 % FCS ersetzt. 72 Stunden nach der Infektion der Zellen wurden diese aus den Kavitäten der 6-well-Platte geerntet und der prozentuale Anteil der transgenen Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Der Virentiter wurde nach folgender Formel berechnet:

$$Titer = \left(\frac{F \cdot Z}{V} \right) TU/ml$$

F = Prozent transgener Zellen

Z = Zellzahl bei Infektion

V = Volumen des eingesetzten Viruskonzentrats

4.5.5. Färbung von Zellen

Zur Antikörperfärbung wurden sich in Suspension befindende Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen (400 g, 5 min, RT) und mit einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$

Zellen in 100 μ l 1 x PBS resuspendiert, wobei ein Mindestvolumen von 50 μ l nie unterschritten wurde. Anschließend wurde eine geeignete Menge des Antikörpers zugegeben, wobei die Anweisungen des Herstellers beachtet wurden. Für $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden meistens zwischen 1,5 μ l und 5 μ l zugegeben. Darauf wurden die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend zweimal mit 1 x PBS gewaschen (400 g, 5 min, RT). Letztendlich wurden die gefärbten Zellen in 1 x PBS resuspendiert und analysiert.

Um den Einbau von BrdU in Zellen nachzuweisen, wurde nach der Anleitung des BrdU Flow Kits der Firma Becton Dickinson verfahren. Zum Nachweis von Annexin V auf der Oberfläche von apoptotischen Zellen wurde das Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit der Firma Becton Dickinson verwendet.

Um Zellen mit DAPI und/oder PI zu färben, wurde unmittelbar vor der Messung ein Volumenprozent einer 1 mg/ml DAPI-Lösung oder ein Volumenpromill einer 1 mg/ml PI-Lösung zu den Zellen gegeben. Beide Farbstoffe interkalieren in der DNA, wodurch sie ein Fluoreszenzsignal in toten Zellen aufweisen, durch deren zerstörte Membranen sie gelangen können. Da beide Farbstoffe nicht durch die intakten Membranen von lebenden Zellen gelangen können, weisen diese kein Fluoreszenzsignal auf.

4.5.6. CFSE-Markierung von Zellen

Zur Markierung von Zellen mit CFSE wurde zunächst eine Lösung von lyophilisiertem CFDASE in wasserfreiem DMSO mit einer Konzentration von 5 mM hergestellt. Anschließend wurden die zu färbenden Zellen zu 1×10^6 Zellen/ml in 1 x PBS mit 0,1 % BSA suspendiert und von der CFDASE-Lösung zu einer Endkonzentration von 10 μ M zugegeben. Nach einer Inkubation für 10 min bei 37 °C wurde die Färbung durch die Zugabe von fünf Volumen eiskaltem RPMI mit 10 % FCS und einer anschließenden Inkubation für 5 min auf Eis unterbrochen. Die Zellen wurden entweder zentrifugiert (400 g, 5 min, RT), in 1 x PBS resuspendiert und direkt in NSG-Mäuse injiziert, oder dreimal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend in Patientenmedium+ kultiviert.

4.5.7. Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometrie

Zur Analyse von Zellen im Durchflusszytometer wurden für die vorliegende Arbeit zwei Apparaturen verwendet, wobei es sich zum einen um ein BD LSRFortessa und zum anderen um ein BD FACSArialIII handelte. Beide Apparaturen waren gemäß den Angaben in Tabelle 8 ausgestattet. Die zu analysierenden Zellsuspensionen wurden vor ihrer Analyse durch ein 70 µm-Netz gesiebt und in ein dafür vorgesehenes Rundbodengefäß oder in ein 15 ml Reaktionsgefäß gefüllt. Die Konzentration der Suspension überstieg nie 1×10^7 Zellen/ml. Bei der Analyse im Durchflusszytometer wurden nicht mehr als 12000 (LSRFortessa) bzw. 8000 (FACSArialIII unter Verwendung der 100 µm-Düse) Ereignisse pro Sekunde gemessen.

Tabelle 8: Ausstattung der Durchflusszytometer

Laser	LP-Filter	BP-Filter	Parameter
LSRFortessa			
355	505	525/50	Indo-1
		450/50	DAPI
405	595	605/12	Qdot 605
	475	525/50	Qdot 525
		450/50	Pacific Blue
488	600	695/40	PerCP-Cy5.5
	505	530/30	FITC, CFSE
		499/10	SSC
561	750	780/60	PE-Cy7
	685	710/50	PE-Cy5.5
	635	670/30	PE-Cy5
	600	610/20	mCherry
	570	585/15	PE
640	750	780/60	APC-Cy7
	710	730/45	Alexa Fluor 700
		670/14	APC-Cy7
FACSArialII			
375/405	735	780/60	Qdot710
	610	616/23	Qdot 605
	556	585/42	PacOrange
	502	530/30	Cerulean
		450/40	DAPI

488	655	695/40	PerCP-Cy5.5
	502	530/30	FITC, CFSE
		488/10	SSC
561	735	780/60	PE-Cy7
	630	670/14	PE-Cy5
	600	610/20	mCherry, mKate
		582/15	PE
633	735	780/60	APC-Cy7
		660/20	APC

Alle Angaben in nm

4.5.8. Sortieren von Zellen mittels MACS

Um NGFR-exprimierende Zellen durch magnetische Zellseparation (englisch „Magnetic Cell Separation (MACS)“) von anderen Zellen zu isolieren, wurde die zu separierende Zellsuspension zentrifugiert (400 g, 10 min, RT) und zu einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in PBE (4 °C) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension durch ein 70 µm Netz gesiebt. Darauf wurde zu je 1×10^7 Zellen 20 µl anti-human NGFR MicroBeads (Miltenyi Biotech) zugegeben, gut gemischt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Währenddessen wurde eine LS-Säule (Miltenyi Biotech) in einem dafür vorgesehen Magneten bei 4 °C positioniert und mit 5 ml PBE präequilibriert. Anschließend wurde die zu separierende Zellsuspension auf die Säule geladen, wobei nie mehr als 2×10^8 Zellen verwendet wurden. Nachdem die Säule viermal mit je 3 ml PBE (4 °C) gespült wurde, wurde sie von dem Magneten genommen, auf ein 15 ml-Reaktionsgefäß gesetzt, mit 5 ml PBE (4 °C) überschichtet und alle sich an der Säule befindenden Zellen durch sanften Druck mit dem dafür vorgesehenen Stempel abgespült. Die isolierten Zellen wurden anschließend einmal mit $1 \times$ PBS gewaschen (400 g, 10 min, RT).

4.5.9. Sortieren von Zellen mittels FACS

Zum Sortieren von Zellen anhand von fluoreszierenden Markern wurde in dieser Arbeit eine BD FACSAriaIII-Apparatur mit einer 100 µm-Düse verwendet. Vor der Sortierung wurden alle Zellsuspensionen durch ein 70 µm Sieb gefiltert. Anschließend wurden die Zellen in einem verschließbaren Reaktionsgefäß mit

Rundboden oder einem 15 ml Reaktionsgefäß überführt und in das zuvor mit Ethanol (80 %) gereinigtem Gerät gemessen. Zum Sortieren wurde immer die Einstellung „purity“ verwendet. Wurden die Zellen für weiterführende funktionelle Untersuchungen sortiert, geschah dies in 15 ml Reaktionsgefäße mit 500 µl Patientenmedium+ oder 500 µl FCS. Zur Analyse der Zellen in vergleichenden Genexpressionsanalysen wurden die Zellen in 200 µl Reaktionsgefäße mit 10 µl Puffer des Kooperationspartners sortiert. Das Sortiergerät wurde wöchentlich einer Leistungsprüfung („performance check“) zur Sicherstellung der gleichbleibenden Leistung und Einstellung der Lichtquellen unterzogen.

4.6. Maus-Xenograft-Modell

Zur Umsetzung der Ziele der vorliegenden Arbeit wurde nicht mit ALL-Zelllinien gearbeitet, da sich diese durch den Prozess ihrer Immortalisierung oder durch langjährige Passagierung *in vitro* seit ihrer Isolierung verändert haben, und sich daher in ihren proliferativen Eigenschaften von ALL-Zellen im Patienten unterscheiden. Die beste Situation zur Untersuchung der ALL ist es, mit primären ALL-Zellen, die direkt aus dem Patienten isoliert wurden, zu arbeiten. Diese können allerdings *in vitro* weder lange kultiviert noch expandiert werden. Um primäre ALL-Zellen außerhalb des Patienten zu expandieren müssen sie in immunkomprimierte Mäuse injiziert werden, aus denen sie wiederum isoliert werden können. Nur dort kann das Wachstumsverhalten von ALL-Zellen außerhalb des Patienten untersucht werden.

Bei den für diese Arbeit verwendeten Tieren handelte es sich um Mäuse des immundefizienten Stammes NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/Sz (Shultz, Lyons et al. 2005), bekannt als NOD scid gamma (NSG). NSG-Mäusen fehlen ausgereifte T-Zellen und B-Zellen. Zusätzlich ist die zytotoxische Aktivität der natürlichen Killerzellen extrem niedrig. Die Tiere wurden bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Die Euthanasie der Tiere erfolgte durch Begasung mit CO₂.

4.6.1. Expansion und Gewinnung primärer ALL-Zellen

Zur Expansion von patientenabgeleiteten ALL-Zellen in NSG-Mäusen wurden Zellen, welche entweder direkt aus dem Patienten oder einer vorherigen Passage gewonnen wurden, intravenös in Tiere injiziert. Hierbei wurden maximal 1×10^7 Zellen verwendet, welche in 200 – 250 µl autoklaviertem und steril filtriertem 1 x PBS suspendiert wurden. Sobald die Zellen injiziert wurden, bekamen die Tiere Ciprofloxacin über das Trinkwasser verabreicht, um Infektionen vorzubeugen. Nach der Zellinjektion wurde den Tieren regelmäßig Blut entnommen, um den Anteil humaner Zellen mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen. Sobald der Anteil der humanen Zellen im Blut 20 % überstieg, wurden die Tiere getötet und die stark vergrößerte Milz isoliert. Die Milz wurde anschließend durch einen 70 µm Sieb homogenisiert und die entstandene Zellsuspension mit 1 x PBS auf 20 ml aufgefüllt. Anschließend wurden 10 ml Ficoll in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit der verdünnten Zellsuspension überschichtet. Darauf wurde das Reaktionsgefäß bei ausgeschalteter Rotorbremse zentrifugiert (400 g, 30 min, RT). Die mononuklearen Zellen wurden im Anschluss mit einer Glaspipette aus dem Gradienten isoliert, zweimal mit 1 x PBS und einmal mit Patientenmedium gewaschen (400 g, 10 min, RT). Das Pellet wurde anschließend in Patientenmedium+ zu einer Konzentration, welche nie 1×10^8 Zellen/ml überstieg, resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung im Inkubator aufbewahrt.

4.6.2. Herstellung transgener Xenograftzellen

Zur lentiviralen Transduktion wurden Xenograftzellen aus der vergrößerten Milz einer Maus isoliert. 5 Millionen der isolierten Xenograftzellen wurden in einer Kavität einer 24-Well-Platte mit 2 µl Viruskonzentrat über Nacht in 500 µl Patientenmedium+ inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen vier Mal mit 1 x PBS gewaschen, in 200 µl 1 x PBS resuspendiert und intravenös in eine NSG-Maus injiziert. Nachdem diese Maus eine Leukämie im Endstadium entwickelt hatte, wurden die Xenograftzellen aus ihrer Milz isoliert und die transgenen Zellen im Durchflusszytometer sortiert. Die sortierten transgenen Zellen wurden erneut intravenös einer NSG-Maus verabreicht. Nachdem diese

Maus wiederum eine Leukämie im Endstadium entwickelt hatte, wurden die Xenograftzellen erneut aus der Milz isoliert. Da alle in dieser Arbeit verwendeten Proben nach diesem Schritt mehr als 90 % Transgenexpression aufwiesen, wurden diese daraufhin für die Durchführung von Experimenten verwendet.

4.6.3. *In vivo* Bildgebung

Für die *in vivo* Bildgebung wurde ein IVIS Lumina II Imaging System (Caliper Life Sciences, Mainz, D) verwendet. Die Mäuse wurden mit Isofluran anästhesiert, in Rückenlage in die Apparatur gelegt, und an den unteren Extremitäten, sowie über den Inhalationsschlauch, fixiert. Eine Stocklösung von Coelenterazin wurde in Methanol mit einer Konzentration von 10 mg/ml hergestellt. Unmittelbar vor der intravenösen Injektion wurde die Stocklösung mit steril filtriertem HBG-Puffer verdünnt. Direkt nach der Injektion des Coelenterazin in die Schwanzvene wurden Bilder der Tiere für die Dauer von 15 Sekunden mit folgenden Einstellungen aufgenommen: „field of view 12,5 cm“, „binning 8“, „f/stop 1“ und „open filter setting“.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Living Image software 4.x (Caliper Life Sciences, Mainz, D). Zur Quantifizierung des Lichtsignales einer Maus wurde ein Analysebereich (englisch „region of interest (ROI)“) festgelegt. Signale wurden als positiv betrachtet, sobald die gemessene Lichtemission in einer ROI das Hintergrundsignal (gemessen in der gleichen ROI an nicht Leukämie-tragenden Mäusen) überstieg (Terziyska, Alves et al. 2012).

4.6.4. Isolierung von Xenograftzellen aus Mausknorpelmark

Zur Gewinnung des Knochenmarks einer Maus wurden die Knochen des Oberschenkels, des Unterschenkels sowie die Hüftknochen, das Brustbein und das Rückgrat eines Tieres isoliert und die Knochen in einem Mörser homogenisiert. Anschließend wurde die entstandene Zellsuspension durch ein 70 µm Sieb homogenisiert und einmal mit 1 x PBS gewaschen (400 g, 10 min, RT). Darauf konnten die Knochenmarkszellen resuspendiert und verwendet werden. Die Menge der isolierten Knochenmarkszellen je Maus variierte abhängig von der Größe des Tieres, zwischen $3,5 \times 10^8$ und $4,5 \times 10^8$ Zellen. Zur

Gewinnung geringer Mengen transgener humaner Xenograftzellen aus dem gesamten Mauseknochenmark wurde wie unter 5.2 beschrieben verfahren.

4.6.5. Isolierung unterschiedlich proliferierender Xenograftzellen

Zur Bestimmung unterschiedlich proliferierender Fraktionen von Xenograftzellen wurde wie unter 5.4 beschrieben verfahren. Die definierten Fraktionen wurden anschließend durch FACS-Sortierung (4.5.9) isoliert.

4.6.6. LDTA

Zur Bestimmung der Frequenz von leukämieinduzierenden Zellen wurden Transplantationen von Zellverdünnungsreihen (englisch „limiting dilution transplantation assays“, LDTA) durchgeführt. Um festzustellen, ob die injizierten Zellen in den Tieren anwachsen, wurden die Tiere, welche die höchsten Zellzahlen erhalten hatten, in regelmäßigen Abständen mittels *in vivo*-Bildgebung analysiert. Sobald eines der Tiere ein durch die transplantierten Zellen verursachtes Signal aufwies, wurde die Gruppe, welche die nächst niedrigere Zellzahl der gleichen Fraktion erhalten hatte, ebenfalls mittels *in vivo*-Bildgebung analysiert. Sobald sich das Verhältnis zwischen Tieren mit einem positiven Signal und Tieren ohne Signal dreimal in Folge nicht verändert hatte, wurde der Versuch ausgewertet.

4.6.7. *In vivo* Therapie

Zur Behandlung von Tieren mit Zytostatika wurden zunächst Verdünnungen der Substanzen in sterilem 1 x PBS hergestellt. Die Substanzen wurden so verdünnt, dass das Endvolumen zwischen 200 und 300 µl betrug. Die Verdünnungen wurden möglichst kurz vor der Injektion hergestellt, um ein Ausfallen der Substanzen zu vermeiden. Das gesamte Volumen der Verdünnung wurde darauf einem Tier intraperitoneal injiziert. Vor der Injektion, sowie an jedem auf die Therapie folgenden Tag, wurde die Masse des Tieres bestimmt. Sobald ein Masseverlust von mehr als 10 % seit Versuchsbeginn oder andere feststellbare Verschlechterungen des Wohlbefindens der Tiere festgestellt wurden, wurden diese abgetötet.

4.6.8. BrdU-Markierung von Xenograftzellen *in vivo*

Für die Markierung von Xenograftzellen mit BrdU *in vivo* wurde Leukämie-tragenden Tieren sieben Tage lang durchgehend BrdU über das Trinkwasser zugeführt. Dazu wurde eine BrdU-Stocklösung mit einer Konzentration von 12 mg/ml in Wasser hergestellt und bei 4 °C gelagert. Vor Verabreichung wurde die Stocklösung in einer Trinkflasche mit Wasser zu einer Konzentration von 0,8 mg/ml verdünnt. Die Wasserflasche musste täglich für die Dauer der Gabe erneuert werden, da BrdU bei Raumtemperatur instabil ist.

5. Ergebnisse

Die gezielte Therapie von ruhenden Tumorzellen ist für die Behandlung der Erkrankung von entscheidender Bedeutung. Für die Entwicklung solcher Therapien muss diese Subfraktion jedoch zunächst identifiziert und charakterisiert werden, was bisher nicht möglich war. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit, die Identifizierung und Charakterisierung einer sich selten teilenden oder ruhenden Fraktion von Zellen der ALL in einem Xenograftmodell mit dem langfristigen Ziel Therapien gegen diese zu entwickeln.

5.1. Generierung von dreifach transgenen ALL-Xenograftproben

Zur Identifizierung von sich selten oder gar nicht teilenden Xenograftzellen wurde das Wachstumsverhalten der ALL-Xenograftzellen untersucht. Um das Wachstum bereits zu einem frühen Stadium der Leukämie zu untersuchen, war es erforderlich, sehr geringe Mengen von humanen Zellen aus dem Knochenmark der Tiere zu isolieren. Da eine Isolierung der Xenograftzellen alleine durch fluoreszenzaktiviertes Zellsortieren (FACS) bei der großen Menge von Knochenmarkszellen, welche aus einer Maus isoliert wurde (4.6.1), nicht angewendet werden konnte, wurde eine neue Isolationsmethode etabliert.

Die neue Methode bestand aus zwei Schritten: einem Magnet-basierenden (MACS), sowie einem Durchflusszytometrie-basierenden (FACS) Anreicherungsschritt. Für die Umsetzung dieser Isolationsmethode wurden zunächst neue, transgene ALL-Xenograftproben hergestellt, welche ein fluoreszierendes Protein (mKate oder mCherry) sowie einen transgenen Oberflächenmarker (NGFR) exprimierten (Fehse, Uhde et al. 1997, Dull, Zufferey et al. 1998, Shcherbo, Merzlyak et al. 2007, Hoffman 2008). Außerdem exprimierten die Zellen eine Luciferase (Gaussia Luciferase, GLuc) mit deren Hilfe die Entwicklung der transgenen Xenograftzellen in der lebenden Maus verfolgt werden konnte (Santos, Yeh et al. 2009). Zur Generierung von stabil transduzierten Xenograftzellen wurde ein lentivirales Transduktionssystem der dritten Generation verwendet (Zufferey, Donello et al. 1999).

5.1.1. Klonierung der Transfervektoren und Virenproduktion

Um dreifach transgene Xenograftzellen zu generieren, wurden zunächst neue lentivirale Transfervektoren kloniert. Dazu wurde als Ausgangsvektor das Plasmid pCH-EF1a-extGluc-T2A-copGFP verwendet, da dieses bereits das Vektor-Rückgrat des Transfervektors für das in dieser Arbeit verwendete lentivirale Transduktionssystem enthielt, sowie das Gen aufwies, welches für eine membrangebundene Version der Luciferase des Tiefseekrebses *Gaussia* (extGluc) codiert (Abbildung 4A). Dieser Vektor wurde bereits zuvor dazu verwendet, Xenograftzellen zu transduzieren, mit denen erfolgreich *in vivo*-Bildgebungsdaten generiert werden konnten (Terziyska, Alves et al. 2012).

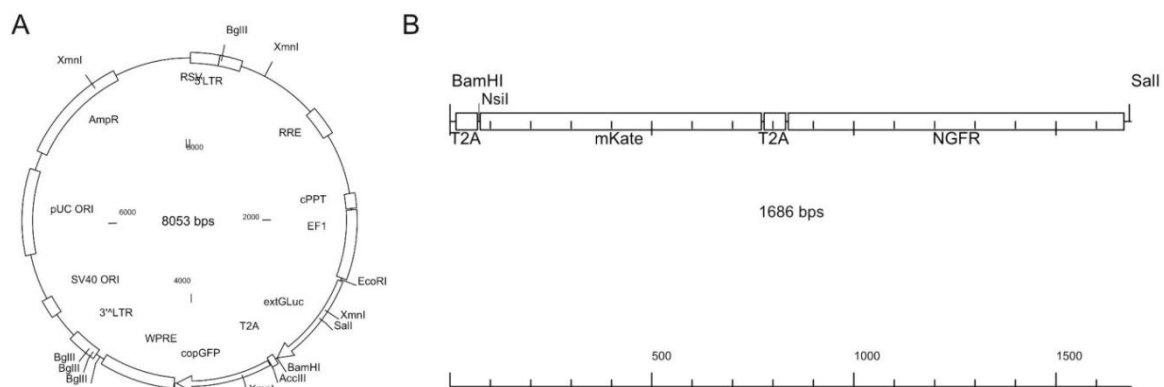


Abbildung 4: Verwendete DNA-Moleküle.

DNA-Moleküle, welche in dieser Arbeit dazu verwendet wurden, um lentivirale Transfervektoren zu klonieren. Dargestellt ist der Ausgangsvektor pCDH-EF1-extGluc-copGFP (A) und das synthetische DNA-Molekül, welches die Gene für mKate und NGFR sowie zwei T2A-Sequenzen beinhaltet.

Das in dem Vektor enthaltene Gen, welches für das grün fluoreszierende Protein copGFP codiert, wurde mit Hilfe der Enzymschnittstellen für *Sall* und *BamHI* ausgeschnitten und durch ein synthetisches DNA-Fragment, welches die Gene für die Proteine mKate und NGFR enthielt (Abbildung 4B), ersetzt. Da das extGluc-Gen ebenfalls eine Schnittstelle für *Sall* aufwies, wurde zunächst eine stille Punktmutation in diesem Gen eingefügt. Dazu wurde eine Mutagenese unter der Verwendung der Primer 259 und 260 durchgeführt (4.3.4). 18 Stunden nach der Transformation des Amplifikationsproduktes des Mutageneseschrittes in kompetente *E. coli* Zellen und deren Ausbringung auf eine Agarplatte mit

Ampicillin wurde von einigen Klonen eine 3 ml Übernachtskultur in LB-Medium mit Ampicillin angeimpft. Eine der Kulturen wurde am nächsten Tag ausgewählt und dessen Plasmid-DNA präpariert. Anschließend wurde die isolierte Plasmid-DNA mit den Enzymen *XmnI*, *BglII* und *SaII* verdaut, um festzustellen, wie viele *SaII*-Schnittstellen in dem isolierten Plasmid enthalten sind. An Hand der durch den Verdau mit *XmnI* und *BglII* entstandenen Fragmente konnte zudem festgestellt werden, ob es sich bei dem isolierten Plasmid noch um den Vektor pCDH-EF1-extGluc-copGFP handelt. Bei einem Verdau des ursprünglichen Vektors mit *XmnI* sind Fragmente mit der Länge 3653 bp, 2141 bp, 1413 bp und 846 bp, bei einem Verdau mit dem Enzym *BglII* Fragmente mit den Längen 4522 bp, 3424 bp, 66 bp und 41 bp zu erwarten. Die verdauten Ansätze wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (Abbildung 5).

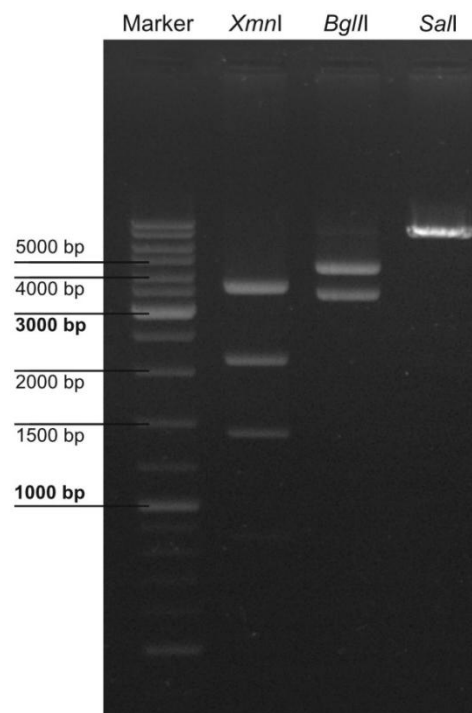


Abbildung 5: Nachweis der Punktmutation.

Agarosegel zur Restriktionskontrolle der präparierten Plasmid-DNA. Es wurde die Plasmid-DNA aus einer Kolonie aufgetragen, in die das Produkt der einzel-Nukleotid-Mutation des Ausgangsvektors pCDH-EF1-extGluc-copGFP transformiert wurde. Die präparierte DNA wurde mit den Enzymen *XmnI*, *BglII* und *SaII* verdaut.

Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, wurde der Vektor durch den Verdau mit *SaII* linearisiert und nicht in mehrere Teile zerlegt. Somit wurde nachgewiesen, dass das Plasmid nur eine Schnittstelle für *SaII* aufwies. Durch den Verdau mit *BglII*

und *XmnI* entstanden Fragmente von erwarteter Größe, wodurch nachgewiesen wurde, dass es sich bei dem isolierten Vektor um das Plasmid pCH-EF1a-extGluc-T2A-copGFP mit einer Punktmutation (pCH-EF1a-extGluc-T2A-copGFP-snm) handelte. Diesem Nachweis folgend wurde eine 50 ml Übernachtskultur in LB-Medium mit Ampicillin mit dem zuvor verwendeten Klon angesetzt und darauf eine Midi-Präparation (4.3.7) des mutierten Vektors pCH-EF1a-extGluc-T2A-copGFP-snm durchgeführt. Der isolierte Vektor wurde mit Hilfe des Primers 214 sequenziert, wodurch die gewünschte Mutation des Vektors bestätigt wurde. Der mutierte Vektor sowie das synthetisierte DNA-Fragment T2A-mKate-T2A-NGFR (Abbildung 4B) wurden daraufhin mit den Enzymen *SaI* und *Bam*HI verdaut und auf ein Agarosegel aufgetragen. Aus beiden Gelen wurde die DNA aus den Zielbanden isoliert (4.3.6) und mit einander in dem Verhältnis Vektor zu Insert 2:1 ligiert (4.3.5). Der Ligationsansatz wurde in kompetente *E. coli* Zellen transformiert, welche anschließend auf Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Darauf wurden sieben Kolonien ausgewählt, mit denen jeweils eine 3 ml Übernachtskultur in LB-Medium mit Ampicillin angesetzt wurde, um mit diesen am nächsten Tag eine Mini-Plasmid-Präparation durchzuführen (4.3.7). Die präparierte Plasmid-DNA aus allen Kolonien wurde mit den Enzymen *Eco*RI und *SaI* verdaut und die Verdauprodukte wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (Abbildung 6).

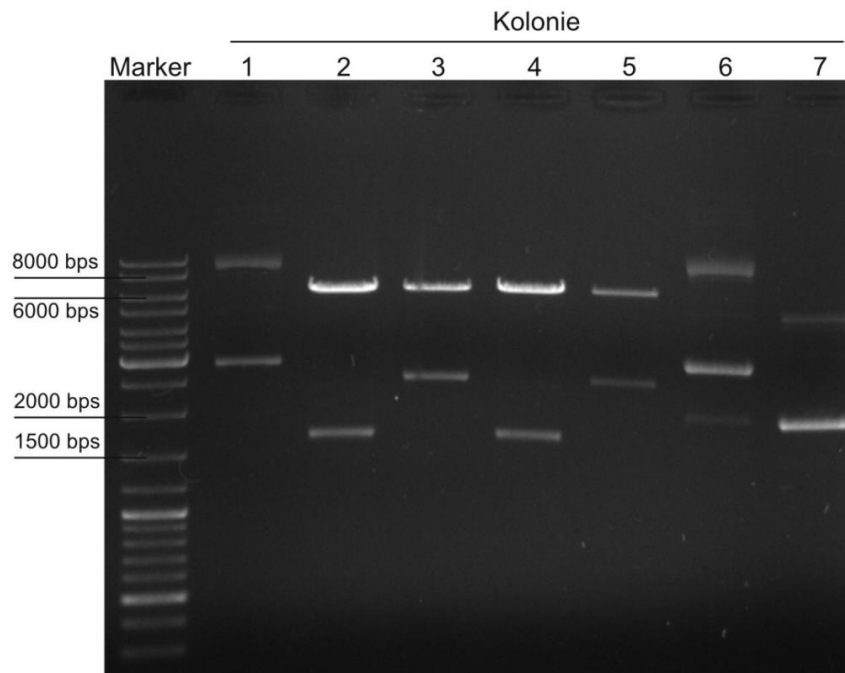


Abbildung 6: Kontrollverdau des Ligationsproduktes.

Agarosegel auf das die Produkte des Restriktionsverdaus von Plasmid-DNA aus sieben Kolonien mit *EcoRI* und *BamHI* aufgetragen wurden. Die Nummern der Bahnen entsprechen den Nummern der Kolonien.

Bei einer erfolgreichen Ligation des Inserts mit dem Fragment werden bei dem Verdau zwei DNA-Fragmente mit den Größen 7207 bp und 1680 bp erwartet. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, beinhalten die Kolonien 3 und 5 das gewünschte Ligationsprodukt. Die Kolonie 3 wurde dazu verwendet, eine 50 ml Übernachtskultur in LB-Medium mit Ampicillin anzusetzen, aus der am folgenden Tag die Plasmid-DNA mittels Midi-Plasmid-Präparation (4.3.7) isoliert wurde. Die Ligation zu dem Vektor pCDH-EF1a-extGluc-T2A-mKate-T2A-NGFR (Plasmid 2) wurde mittels Sequenzierung mit dem Primer 197 bestätigt. Anschließend wurde der Vektor als Template für eine PCR mit den beiden Primern 262 und 263 verwendet, wodurch das Gen, welches für NGFR codiert, mit überhängenden Schnittstellen für *SaI* und *NsiI* amplifiziert wurde. Das Amplifikationsprodukt, sowie das Plasmid 2 wurden mit *SaI* und *NsiI* verdaut und die Verdauprodukte in Agarosegelen aufgetrennt. Das Vektorrückgrad, sowie das verdaute PCR-Produkt, wurden aus den Gelen gewonnen (4.3.6) und im Verhältnis 1:1 miteinander ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in kompetente *E. coli* Zellen transformiert und diese auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgebracht. Nach einer Inkubation über Nacht wurden 23 Kolonien für eine Kolonie-PCR mit den Primern 196 und 197 ausgewählt. Bei einer Ligation zu Vektor pCDH-EF1-

extGluc-T2A-NGFR (Plasmid 3) ist ein PCR-Produkt mit einer Länge von 1796 bp zu erwarten. Handelt es sich bei dem Template der PCR um eine Religation zu Plasmid 2 entsteht ein PCR-Produkt mit einer Länge von 2558 bp. Die Produkte der Kolonie-PCR wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und analysiert (Abbildung 7).

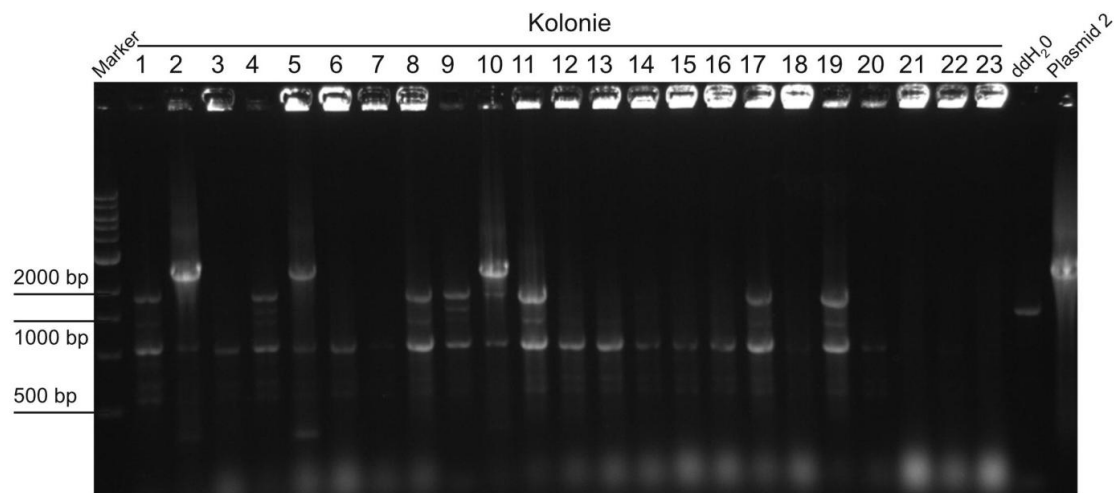


Abbildung 7: Kolonie-PCR der Ligationsprodukte.

Agarosegel, auf das die PCR-Produkte der Kolonie-PCR zur Bestimmung der korrekten Ligation des Plasmids 3 aufgetragen wurden. Die Nummern der Bahnen entsprechen den Nummern der ausgewählten Kolonien.

In Abbildung 7 ist zu sehen, dass unter anderem bei einer PCR mit Kolonie 3 als Template das erwartete Ligationsprodukt entsteht. Daher wurde eine 50 ml Übernachtskultur in LB-Medium mit Ampicillin mit Kolonie 3 angeimpft, um am nächsten Tag die Plasmid-DNA aus der Kultur durch Midi-Präparation zu gewinnen. Das Präparationsprodukt wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Unter Verwendung der klonierten Vektoren Plasmid 2 (Abbildung 8A) und Plasmid 3 (Abbildung 8B) und des im Labor vorrätigen Vektors Plasmid 5 (pCDH-EF1a-extGluc-T2A-mKate-T2A-mCherry; Abbildung 8C) wurden Lentiviren hergestellt, wie es unter 4.5.3 beschrieben ist. Nachdem die Viren hergestellt wurden, konnte ihr Titer bestimmt werden (4.5.4; Tabelle 9).

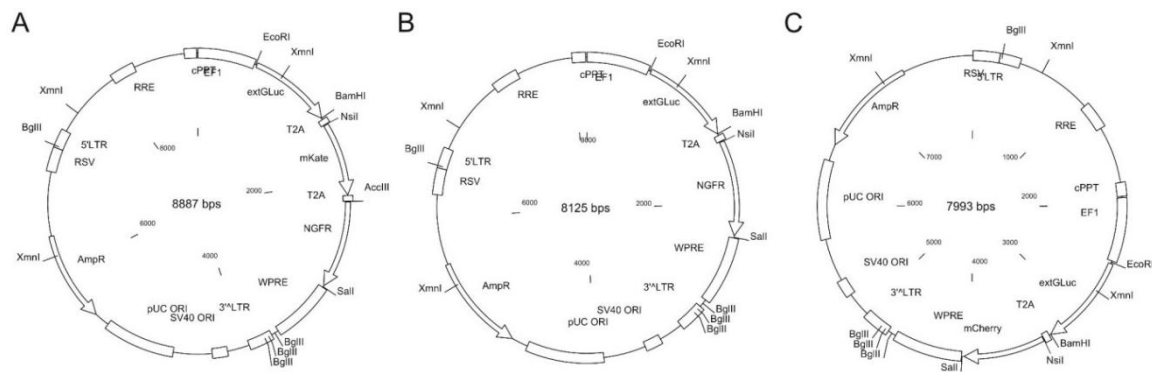


Abbildung 8: zur Virenproduktion verwendete Vektoren.

Karten der Vektoren Plasmid 2 (A), Plasmid 3 (B) und Plasmid 5 (C). Die Expressionskassetten aller Vektoren enthalten das Gen, welches für die membrangebundene Variante der Gaussia-Luciferase codiert. Zusätzlich enthält Plasmid 2 die Gene für mKate und NGFR, das Plasmid 3 das Gen für NGFR und das Plasmid 5 das Gen für mCherry.

Tabelle 9: Virentiter

Virus	Plasmid	Titer (transduzierende Einheiten/ml)
2	2 (pCDH-EF1-extGluc-T2A-mKate-T2A-NGFR)	$7,78 \times 10^8$
3	3 (pCDH-EF1-extGluc-T2A-NGFR)	$5,94 \times 10^{10}$
5	5 (pCDH-EF1-extGluc-T2A-mCherry)	$1,04 \times 10^{11}$

Wie in Tabelle 9 zu sehen ist, wies Virus 2 einen wesentlich niedrigeren Titer auf als die anderen beiden Viren. Vermutlich begründet sich dieser Unterschied darin, dass der Transfervektor zur Herstellung des Virus 2 um mindestens 760 bp größer war als die Transfervektoren, welche zur Herstellung der Viren 3 und 5 verwendet wurden. Möglicherweise können daher unter Verwendung von Plasmid 2 bei Anwendung des gleichen Protokolls weniger infektiöse Partikel hergestellt werden als bei Verwendung der anderen beiden Plasmide.

Zusammenfassend wurden in 5.1.1 neue Transfervektoren kloniert, unter deren Verwendung Lentiviren produziert wurden. Durch die Infektion mit diesen Viren können Zellen generiert werden, welche drei Transgene, eine Luciferase, ein rot fluoreszierendes Protein und NGFR exprimierten.

5.1.2. Transduktion von ALL-Xenograftzellen

Die unter 5.1.1 beschriebenen Viren wurden dazu verwendet, die ALL-Xenograftproben 199, 233 und 265 (Tabelle 10) zu transduzieren. Alle drei

Proben stammen von Kindern mit prä-B-ALL der Hochrisikogruppe oder von Kindern, die bereits einen mehrmaligen Krankheitsrückfall erlitten haben. Alle drei Proben weisen relativ kurze Passagezeiten in der Maus auf.

Tabelle 10: Verwendete prä-B-ALL-Xenograftproben.

Probe	Ursprung	genetische Alterationen	Passagendauer
199	achtjähriges Mädchen	zweites Rezidiv, somatische Trisomie 21, Deletion 9p	42 Tage
233	drei Monate alter Junge	t(2;15)(p13;q15)	76 Tage
265	pädiatrisch, Hochrisikogruppe	unbekannt	43 Tage

Zur Transduktion der Xenograftzellen wurde bevorzugt Virus 2 verwendet, da durch ihn transduzierte Zellen den transgenen Oberflächenmarker NGFR sowie das rot fluoreszierende Protein mKate im gleichen Mengenverhältnis produzieren und nur eine einmalige Transduktion nötig ist. Der Nachteil dieses Virus gegenüber einer kombinierten Transduktion mit den Viren 3 und 5 ist sein bereits zuvor erwähnter niedrigerer Titer (Tabelle 9).

Die transduzierten Zellen wurden in NSG-Mäuse injiziert. Nachdem die Tiere eine Leukämie im Endstadium entwickelt hatten (Tabelle 10), wurden die Zellen wieder aus der Milz isoliert. Nach der Isolierung aller Xenograftzellen wurde der prozentuale Anteil der transduzierten Zellen, und somit die Transduktionseffizienz, durch eine durchflusszytometrische Analyse ermittelt. Es wurden nur Xenograftzellen weiter verwendet, welche nach der ersten Transduktion zu mindestens 5 % beide Transgene produzierten, was bei den Proben 199 und 265 unter Verwendung von Virus 2 gelang. Aufgrund des niedrigeren Titers des Virus und der schlechten Transduzierbarkeit der Probe 233 war es nicht möglich, diese Probe mit Virus 2 zu über 5 % zu transduzieren. Erfolgreich war dagegen, die kombinierte Transduktion mit Virus 3 und 5 um Zellen der Probe 233 zu generieren, welche sowohl NGFR als auch mCherry exprimierten. Somit konnten für alle drei in dieser Arbeit verwendeten Xenograftproben innerhalb einer Mauspassage zu mindestens 5 % Zellen generiert werden, welche die drei Transgene extGluc, NGFR sowie mKate oder mCherry exprimierten.

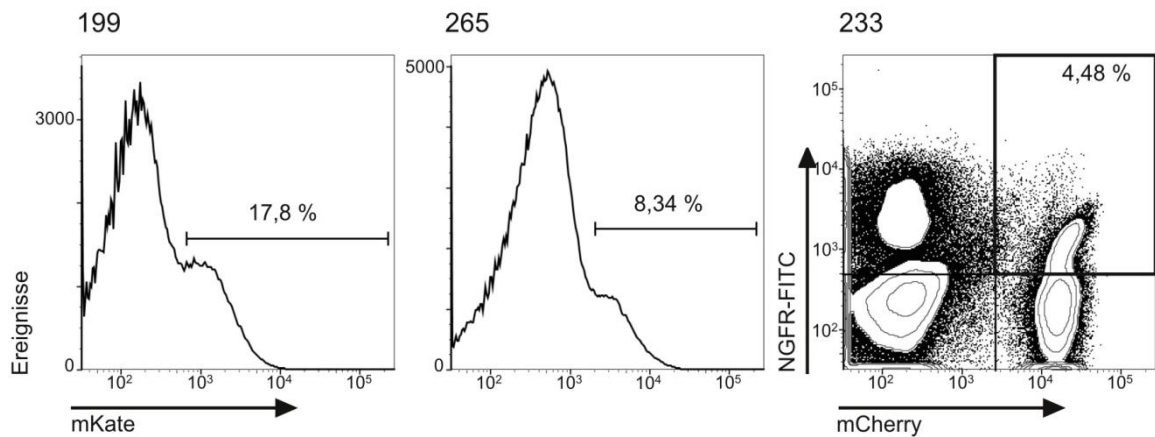


Abbildung 9: Sortieren der transfizierten ALL-Xenograftzellen.

Durchflusszytometrische Analyse transduzierter Zellen der Proben 199, 233 und 265. Aus den Zellsuspensionen wurden die Ereignisse durch FACS-Sortierung isoliert, welche mKate (199 und 265) oder mCherry und NGFR (233) exprimieren.

Zur Generierung von transgenen Proben, welche zu über 90 % sowohl NGFR als auch ein rot fluoreszierendes Protein exprimierten, wurden die aus der Milz gewonnenen Zellen mittels FACS sortiert (4.5.9; Abbildung 9) und erneut in NSG-Mäuse injiziert. Nachdem die Zellen in der Maus zu einer Leukämie im Endstadium mit vergrößerter Milz expandiert waren, wurden die Xenograftzellen aus der Milz isoliert.

Die Expression der Transgene in den isolierten Zellen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 10), Durchflusszytometrie (Abbildung 11) und *in vivo*-Bildgebung (Abbildung 12) untersucht.

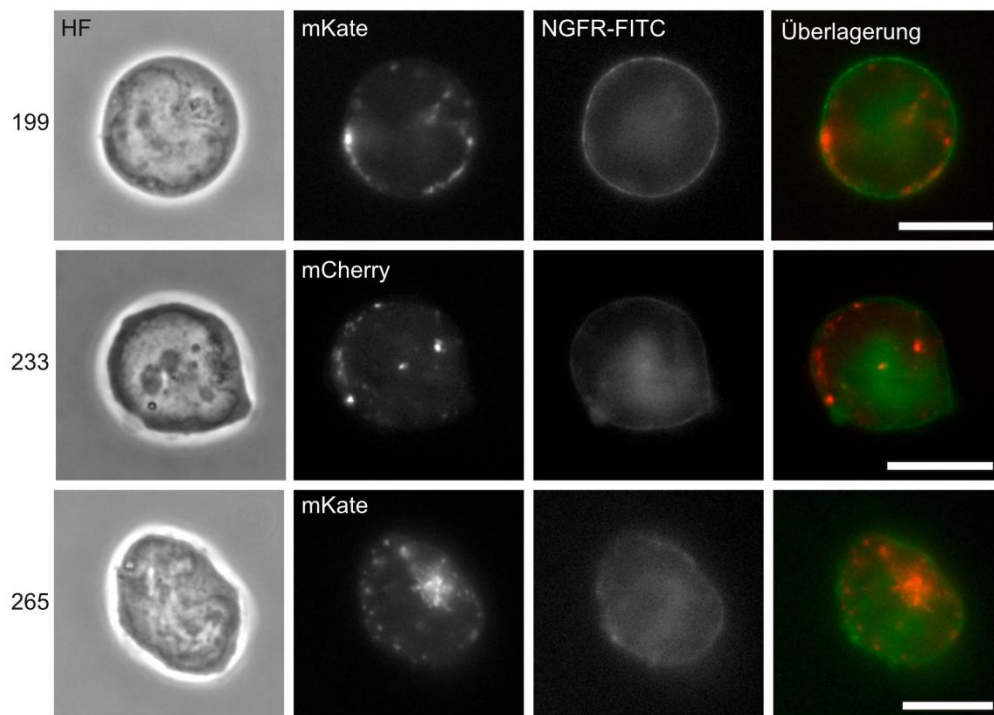


Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Analyse transduzierter ALL-Xenograftzellen.

Exemplarische Darstellungen von jeweils einer Zelle der ALL-Xenograftproben 199, 233 und 265. Die Zellen wurden vor der Analyse mit einem FITC-gekoppeltem Maus anti-Human NGFR-Antikörper gefärbt. HF = Helfeld, Balken entspricht 10 μ m, Vergrößerung 1000x.

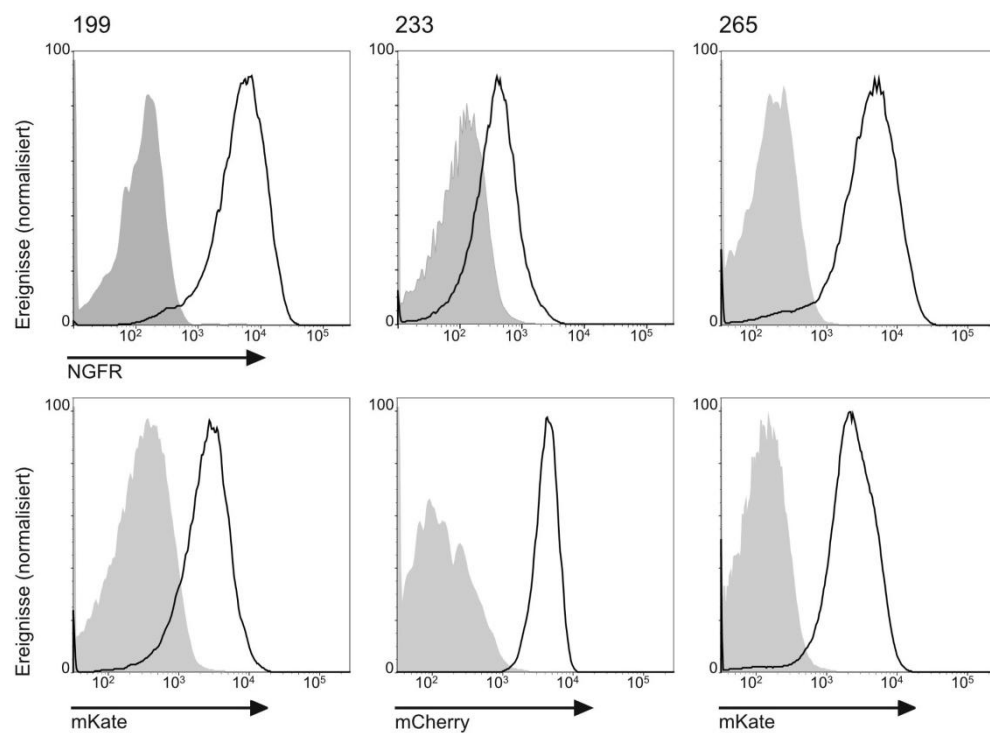


Abbildung 11: Nachweis der Transgenexpression mittels Durchflusszytometrie.

Transgene Zellen der Proben 199, 233 und 265 wurden nach ihrer Isolierung mit einem FITC-gekoppelten Maus-anti-Human Antikörper gegen NGFR gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

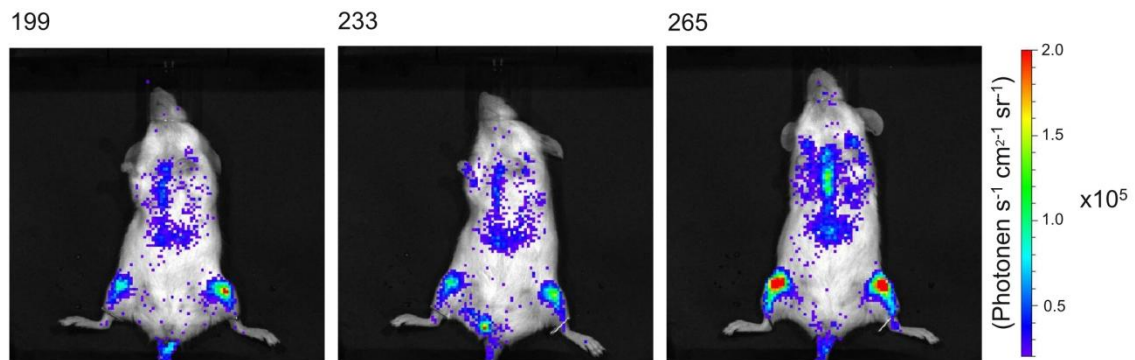


Abbildung 12: Nachweis der Transgenexpression mittels in vivo-Bildgebung.

10 Millionen transgene Zellen der Proben 199, 233 und 265 wurden intravenös in NSG-Mäuse injiziert und 14 Tage nach der Injektion im Luminometer analysiert. Die Signale in der Mitte des Abdomens sind unspezifisch. Einheiten der Farbskala sind Photonen pro Sekunde pro cm^2 pro Steradian ($\text{Photonen s}^{-1} \text{cm}^{-2} \text{sr}^{-1}$).

Alle drei Proben exprimierten zu mindestens 90 %, sowohl das Transgen NGFR als auch eines der rot fluoreszierenden Proteine mKate (Probe 199 und 265) oder mCherry (Probe 233) (Abbildung 13).

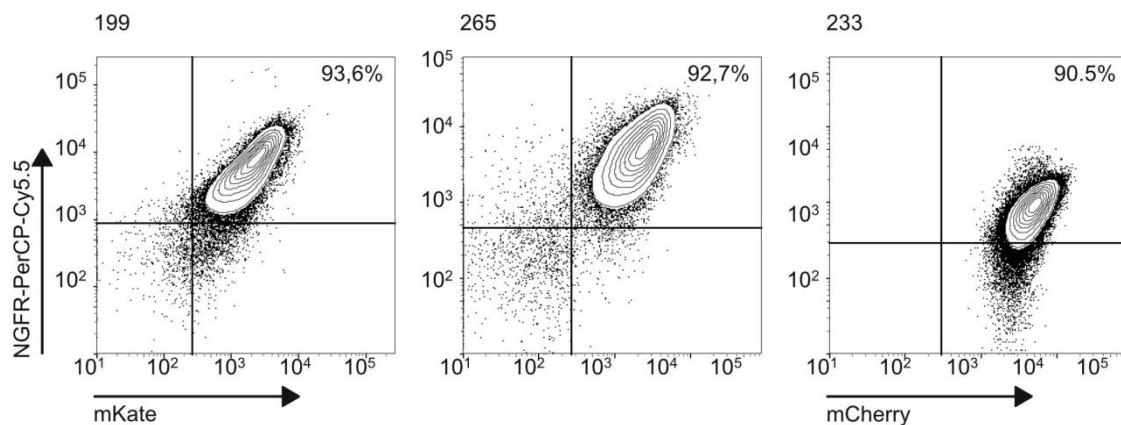


Abbildung 13: Quantifizierung der Transgenexpression

Durchflusszytometrische Analyse der transgenen ALL-Xenograftproben 199, 233 und 265. Die Zellen wurden nach ihrer Isolierung mit einem PerCP-Cy5.5-gekoppelten Maus-anti-Human Antikörper gegen NGFR gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

Zusammengenommen wurden die hier vorgestellten ALL-Xenograftproben unter Verwendung neuer Lentiviren genetisch modifiziert, wodurch diese drei Transgene exprimierten. Bei den drei Transgenen handelte es sich um ein rot fluoreszierendes Protein, einen transgenen Oberflächenmarker und eine Luciferase. Die drei hier vorgestellten transgenen ALL-Xenograftproben wurden für alle weiteren Experimente im Verlauf der vorliegenden Arbeit verwendet.

5.2. Isolierung von transgenen ALL-Xenograftzellen aus murinem Knochenmark

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine sich selten teilende Fraktion von ALL-Xenograftzellen unter Verwendung des Proliverationsmarkers CFSE zu identifizieren und zu charakterisieren. Daher wurde nach der Generierung von drei dreifach transgenen ALL-Xenograftproben (5.1.2) eine Methode etabliert, mit der geringe Mengen dieser Zellen im Knochenmark von NSG-Mäusen detektiert und aus diesem isoliert werden können. Dazu wurden in einem ersten Schritt die NGFR-exprimierenden Xenograftzellen durch einen magnetischen Zellseparationsschritt (MACS) von dem Großteil der Knochenmarkszellen getrennt. Aus der durch diese positive Selektionierung entstandenen Zellsuspension wurden im Anschluss die Xenograftzellen durch fluoresszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) unter Verwendung des rot fluoresszierenden Proteins isoliert (Abbildung 14).

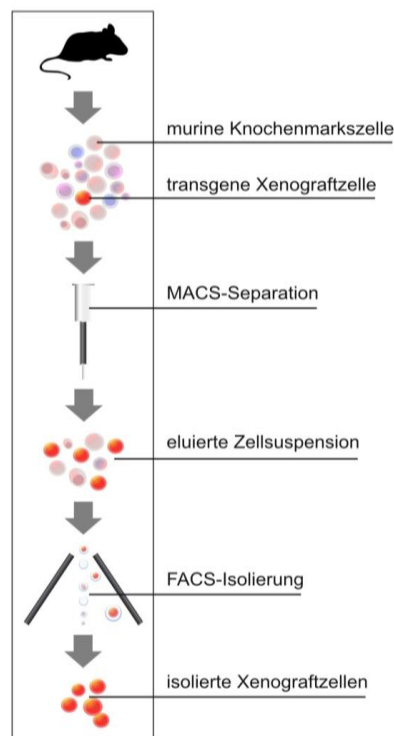


Abbildung 14: Schema der Isolationsmethode.

Schematische Darstellung des Protokolls zur Detektion und Isolierung von geringen Mengen transgener ALL-Xenograftzellen aus dem Knochenmark von NSG-Mäusen unter der Verwendung von MACS und FACS.

Zur Durchführung der Isolation wurde das Knochenmark von Leukämie-tragenden NSG-Mäusen isoliert (4.6.1). Anschließend wurde die Zellzahl der Suspension bestimmt und die NGFR-exprimierenden Zellen durch MACS angereichert (4.5.8). Die entstandene Zellsuspension wurde im Anschluss mit einem APC-Cy7-markierten Ratte anti-Maus CD45-Antikörper und einem PerCP-Cy5.5 gekoppelten Maus anti-Human NGFR-Antikörper gefärbt (4.5.5). Direkt vor der Messung wurde ein Volumenprozent einer 1 mg/ml DAPI-Lösung zu der Zellsuspension gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen in der Sortiereinheit analysiert und die transgenen Xenograftzellen detektiert (Abbildung 15). Dabei wurde ein FSC/SSC-Gate verwendet, welches zuvor um eine Population reiner Xenograftzellen der gleichen Probe unter Verwendung derselben Geräteeinstellungen gesetzt wurde (Abbildung 15 G1). Die in G1 enthaltenen Zellen wurden auf die Expression des murinen Oberflächenmarkers CD45 und ihrer Vitalität mittels DAPI analysiert. Ereignisse, welche für diese beiden Marker negativ waren (Abbildung 15 G2), wurden auf ihre Expression der beiden transgenen Marker NGFR und mKate bzw. mCherry untersucht. Bei den doppelt positiven Ereignissen (Abbildung 15 G3) handelt es sich um die transgenen Xenograftzellen.

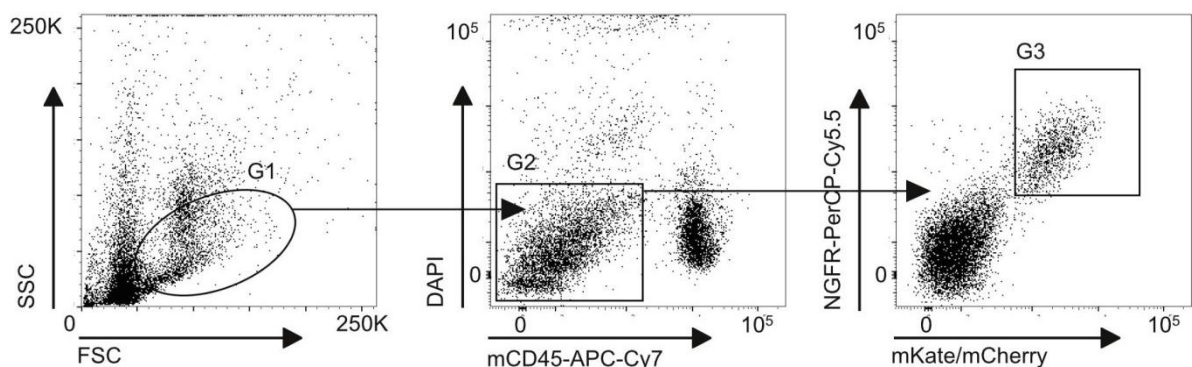


Abbildung 15: Gating-Strategie der FACS-Isolierung.

Exemplarische Gating-Strategie zur Isolierung von Xenograftzellen aus dem Knochenmark von NSG-Mäusen nach dem MACS-Schritt. Dargestellt ist MACS-sortiertes Knochenmark einer Maus, in die Xenograftzellen der Probe 265 injiziert wurden. Durch die abgebildete Strategie werden DAPI und mCD45-negative, mKate und NGFR positive Zellen mit definierten FSC/SSC-Eigenschaften isoliert.

Zur Prüfung der Effektivität der Detektion von Xenograftzellen nach der etablierten Methode wurden bekannte Mengen von transgenen Xenograftzellen

der Probe 199 mit 100 Millionen murinen Knochenmarkszellen gemischt. Die Anzahl der untergemischten Xenograftzellen betrug dabei 125, 1250, 12500 und 37500 Zellen. Als Kontrolle diente Knochenmark ohne Xenograftzellen. Die Xenograftzellen wurden mittels MACS angereichert (4.5.8), wobei die Zellzahl der gesamten Suspension vor und nach dem MACS-Schritt bestimmt wurde (Tabelle 11). Tabelle 11 zeigt, dass die Gesamtzellzahl der Zielsuspension durch den MACS-Schritt im Durchschnitt um den Faktor 136 reduziert wurde.

Tabelle 11: Reduktion der Zellzahl durch MACS.

Zellzahl vor MACS (x10⁶)	Xenograftzellen	Zellzahl nach MACS (x10⁶)	Reduktion der Zellzahl durch MACS
100	0	0,696	144x
100	125	0,646	156x
100	1250	0,753	133x
100	12500	0,676	148x
100	37500	1,02	98x

An der Säule blieben stets über 600.000 Zellen haften, selbst wenn keine Xenograftzellen in der Knochenmarkssuspension vorhanden waren. Hierbei muss es sich um eine unspezifische Bindung der MicroBeads an Knochenmarkszellen oder um eine direkte Bindung der Knochenmarkszellen an die Säule handeln. Allerdings konnte durch den MACS-Schritt die Zellzahl der Suspension, welche die Xenograftzellen enthalten sollte, stark genug reduziert werden, um eine Analyse der gesamten Suspension im Durchflusszytometer zu ermöglichen. Um festzustellen, wie viele Xenograftzellen nach dem MACS-Schritt noch in der Zellsuspension vorhanden sind, wurde die von den Säulen eluierten Zellsuspensionen mit Antikörpern gegen murines CD45 und NGFR sowie mit DAPI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 16). In Abbildung 16 ist zu sehen, dass bei der Durchführung der Methode mit einer Zellsuspension ohne Xenograftzellen einige Ereignisse im mKate und NGFR-positiven Gate erscheinen. Diese 88 Ereignisse (Tabelle 12) bestimmen den Hintergrund der angewandten Methode, welcher die minimale Anzahl an transgenen Xenograftzellen festlegt, über deren Vorhandensein eine Aussage getroffen werden kann. Dieser Hintergrundwert kann von den DAPI-negativen, mCD45-negativen, mKate-positiven, NGFR-positiven gemessenen Ereignissen

abgezogen werden, um die absolute Zahl von vorhandenen Xenograftzellen zu bestimmen (Tabelle 12).

eingesetzte
Zellen:

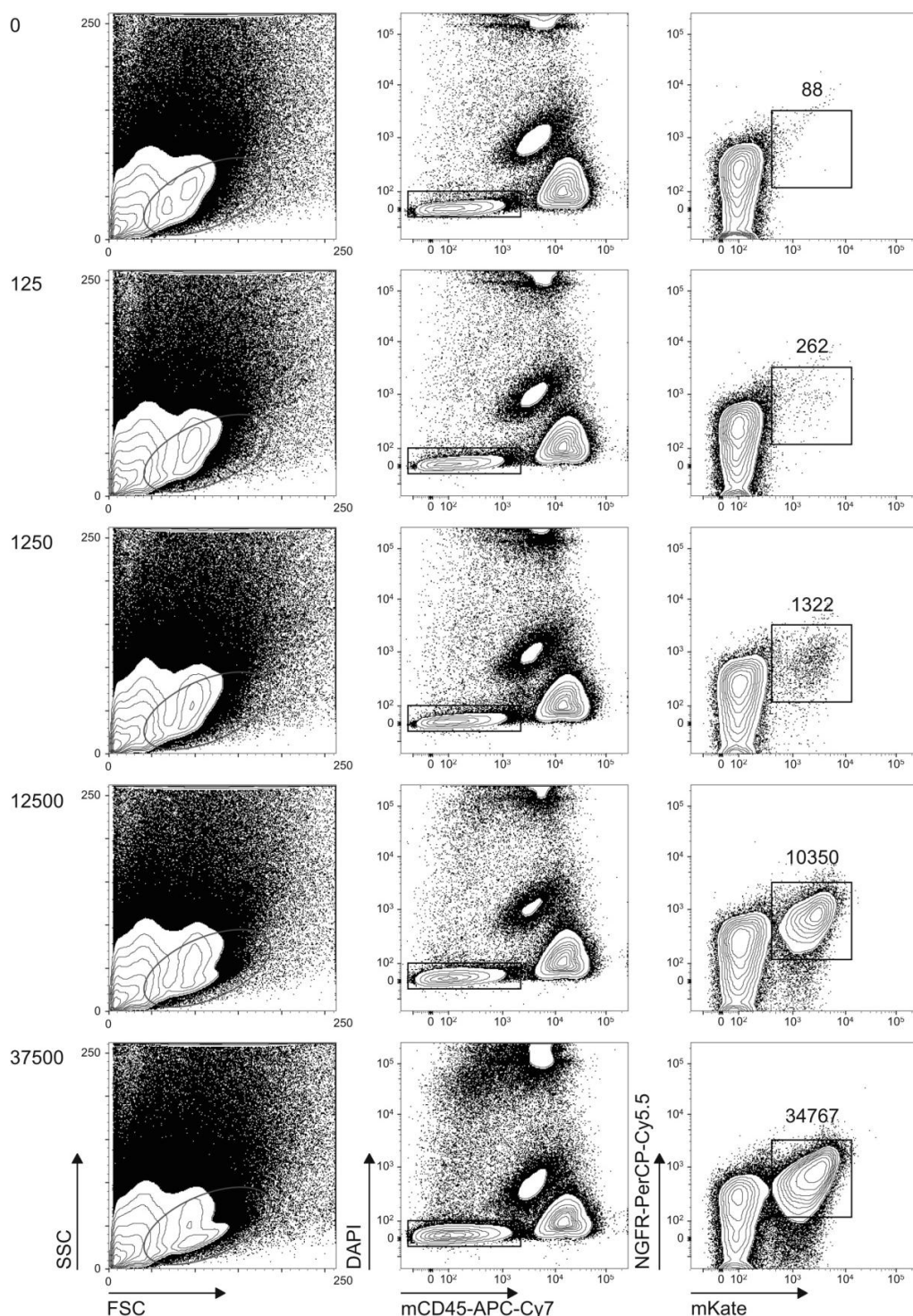


Abbildung 16: Validierung der Detektionsmethode.

Durchflusszytometrische Analyse unterschiedlicher Zellsuspensionen nach MACS-Sortierung. Jede Zellsuspension bestand vor dem MACS-Schritt aus 100 Millionen Knochenmarkszellen, zu denen unterschiedliche Mengen (0, 125, 1250, 12500 und 37500) transgener 199-Zellen gegeben wurden.

Tabelle 12: Validierung der Detektionsmethode.

Eingesetzte Xenograftzellen	Gemessene Ereignisse (DAPI-, mCD45-, NGFR+, mKate+)	Gemessene Ereignisse ohne Hintergrund	Verlust durch MACS und Detektion
0	88	0	-
125	262	174	0 %
1250	1322	1234	1 %
12500	10350	10262	18 %
37500	34767	34679	8 %

Vergleicht man die Anzahl der gemessenen Ereignisse nach Abzug des Hintergrundes mit der Anzahl der ursprünglich eingesetzten Anzahl der Xenograftzellen, sind nur geringe Verluste durch den MACS-Schritt und somit der hier vorgestellten Detektionsmethode zu verzeichnen. Mit maximal 18 % Verlust (bei 12500 eingesetzten Zellen) ist die hier vorgestellte Methode dazu in der Lage, die absolute Zellzahl transgener Xenograftzellen im gesamten Knochenmark von NSG-Mäusen bis zu einem Prozentanteil von 0,000125 % des gesamten Knochenmarks genau zu bestimmen.

Für die Durchführung weiterer Experimente war nicht nur die Detektion sondern auch die Isolierung transgener ALL-Xenograftzellen notwendig. Daher wurden die transgenen Zellen in der Zellsuspension, in die 37.500 Zellen eingesetzt worden waren, nicht nur detektiert, sondern auch aus dieser isoliert. Die isolierte Zellfraktion wurde anschließend erneut im Durchflusszytometer gemessen (Abbildung 17). Hierbei konnten 28.120 sortierte Ereignisse isoliert und erneut detektiert werden, was 75 % der ursprünglich eingesetzten Zellmenge entspricht.

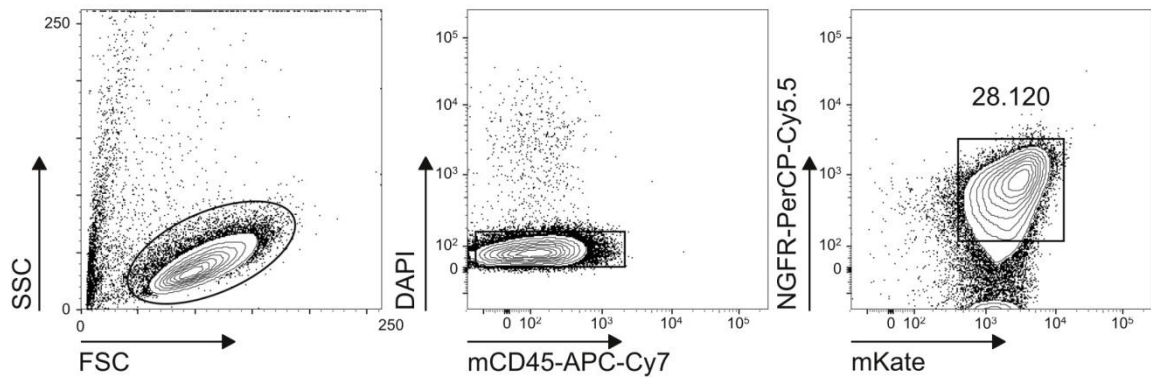


Abbildung 17: Reanalyse sortierter Zellen.

Reanalyse der isolierten Ereignisse nach MACS und FACS-Isolierung von 37500 199-Zellen aus 100 Millionen Knochenmarkszellen einer NSG-Maus.

Zusammengenommen wurde eine neue Methode erfolgreich etabliert, die es erlaubt, geringe Mengen von ALL-Xenograftzellen aus dem Knochenmark von NSG-Mäusen zu isolieren. Die Methode basiert auf der rekombinanten Expression von NGFR und mKate oder mCherry in den ALL-Xenograftzellen und zwei Anreicherungsschritten: einem MACS-Schritt, bei dem NGFR-exprimierende Zellen angereichert werden, und einem FACS-Schritt, bei dem Xenograftzellen, welche mKate- bzw. mCherry und NGFR exprimieren, detektiert und isoliert wurden. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde stets die hier beschriebene Methode dazu verwendet, Xenograftzellen im Knochenmark Leukämie-tragender NSG-Mäuse zu detektieren und zu isolieren.

5.3. Untersuchung des spontanen Wachstums von Xenograftzellen im Knochenmark von NSG-Mäusen

Nachdem eine Methode etabliert wurde, um geringe Mengen von Xenograftzellen im Knochenmark von NSG-Mäusen zu detektieren (5.2), war es das erste Ziel das Wachstumsverhalten humaner ALL-Xenograftzellen im Knochenmark von NSG-Mäusen zu untersuchen. Dazu wurden von allen drei in dieser Arbeit generierten dreifach transgenen ALL-Xenograftproben (5.1.2) je 10 Millionen Zellen intravenös in NSG-Mäuse injiziert. Drei Tage nach der Injektion konnte bei allen drei Proben nur ein geringer Anteil der injizierten Zellen im Knochenmark wiedergefunden werden (Abbildung 18).

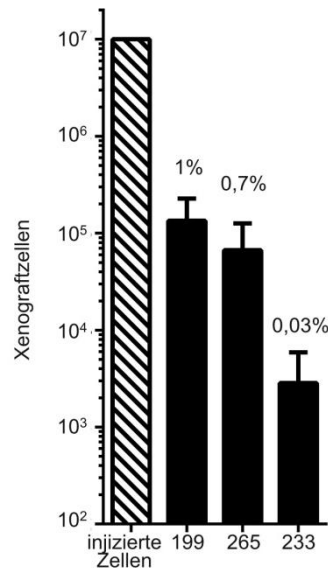


Abbildung 18: Anteil der im Knochenmark anwachsenden Xenograftzellen.

10 Millionen Zellen der transgenen Xenograftproben 199, 233 und 265 wurden intravenös in NSG-Mäuse injiziert. Drei Tage später wurden die Xenograftzellen aus dem Knochenmark isoliert und ihre Zellzahl bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. (n=2)

Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, waren stets weniger als 1 % der injizierten Zellen am Zeitpunkt der Isolation im Knochenmark unter Anwendung der etablierten Methode auffindbar. Im Fall der Probe 233 betrug der Anteil der wiedergefunden Zellen 0,03 %. Daher war die Effizienz des Anwachsens im Knochenmark sehr gering und Probenabhängig. In anderen Organen der Tiere, wie der Milz, der Leber und der Lunge konnten in den ersten Tagen nach Injektion keine Xenograftzellen nachgewiesen werden, weshalb davon ausgegangen wurde, dass alle Zellen, die nicht im Knochenmark nachgewiesen werden konnten, abgestorben waren. Daher beschränken sich die hier vorgestellten Wachstumsanalysen auf das Wachstum der Xenograftzellen zu frühen Zeitpunkten im Knochenmark.

Zur Verfolgung des Wachstums der ALL-Xenograftzellen im Knochenmark im Laufe der Zeit wurden mehrere Tiere parallel mit 10 Millionen Xenograftzellen der gleichen Suspension intravenös injiziert. Die Xenograftzellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion aus je einem der Tiere isoliert (5.2). Der späteste Zeitpunkt der Isolation war 21 Tage nach Zellinjektion, da durch *in vivo*-Bildgebung gezeigt werden konnte, dass zu einem späteren Zeitpunkt das Auswandern von Xenograftzellen in andere Organe der Maus zunahm (Abbildung 19).

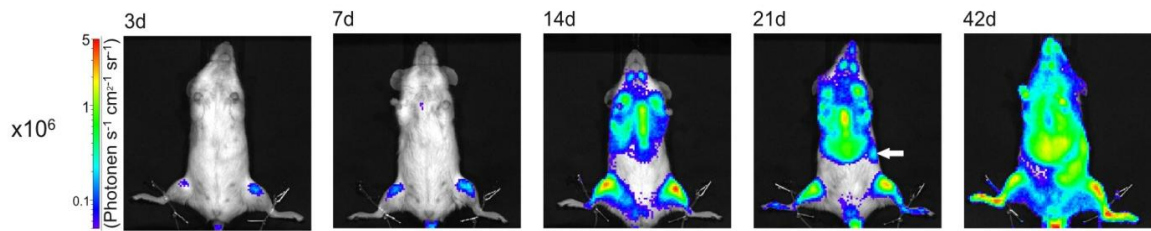


Abbildung 19: Verlauf einer Xenograft-Leukämie

In vivo-Bildgebungsdaten einer Maus, in welche 10 Millionen Zellen der transgenen Xenograftprobe 265 injiziert wurden. Die Maus wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Zellinjektion analysiert. 21 Tage nach Zellinjektion können erste Signale der Leukämie außerhalb des Knochenmarks (Pfeil) festgestellt werden. d = Tage

Die Anzahl der isolierten Xenograftzellen wurde zu jedem Isolationszeitpunkt durch FACS-Analyse der gesamten MACS-sortierten Suspension bestimmt (Abbildung 20).

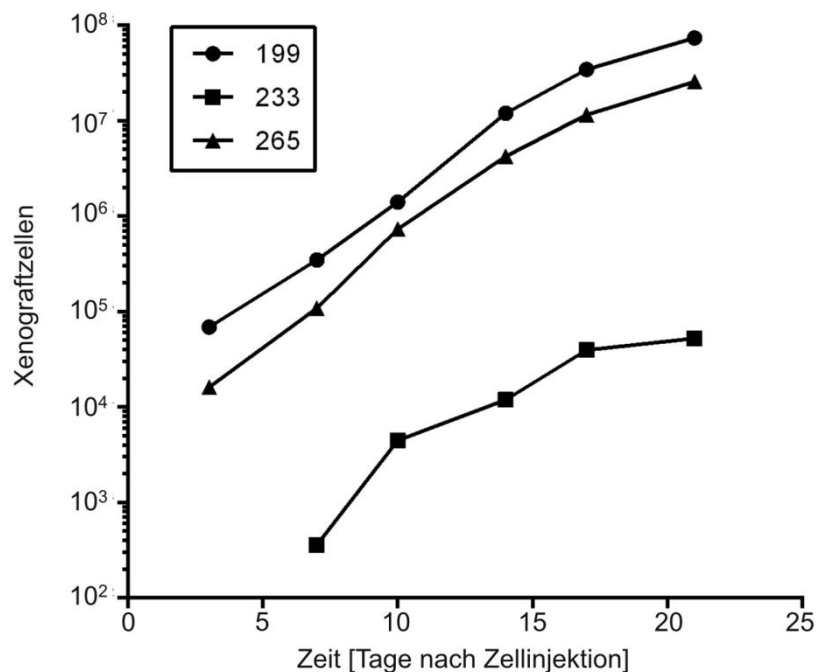


Abbildung 20: Wachstum der ALL-Proben im Knochenmark.

Zellzahl von isolierten transgenen Xenograftzellen der Proben 199, 233 und 265 an verschiedenen Zeitpunkten nach Zellinjektion.

Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, nahm die Anzahl der Xenograftzellen im Knochenmark der Tiere kontinuierlich zu. Weniger in der Entwicklung des Wachstums, wohl aber bei der zu unterschiedlichen Zeitpunkten isolierbaren Zellzahl von Xenograftzellen, waren große Unterschiede zwischen den drei Proben festzustellen. Die Wachstumskurven der Proben 199 und 265 starten mit

höheren Werten als die Kurve der Probe 233. Die Kurven aller drei Proben verlaufen dann jedoch annähernd parallel zueinander, was auf eine vergleichbare Generationszeit für alle drei Proben hinweist. Im Zeitraum vom Beginn der Wachstumskurve bis etwa 17 Tage nach Zellinjektion nahm die Zellzahl bei allen drei Proben exponentiell zu. Anhand der Zellzahlen zum jeweils ersten Messzeitpunkt, sowie den Zellzahlen der darauf folgenden Messpunkte, lässt sich die Wachstumsrate der exponentiellen Phase aller drei Proben berechnen.

Formel zur Berechnung der Wachstumsrate:

$$\text{Wachstumsrate } (t_0, t) = \left(\frac{A(t)}{A(t_0)} \right)^{\frac{1}{N}} - 1$$

t_0 = Zeitpunkt des ersten Messwertes

t = Messzeitpunkt

$N = t - t_0$

$A(t)$ = Zellzahl zum Zeitpunkt t

$A(t_0)$ = Zellzahl zum Zeitpunkt t_0

Abhängig vom Wert t ergaben sich für jede Probe mehrere Wachstumsraten. Aus diesen wurde für jede Probe die mittlere Wachstumsrate (k), durch Berechnung des geometrischen Mittels, bestimmt.

Formel für geometrisches Mittel:

$$\text{Geometrisches Mittel} = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdots x_n}$$

Die mittlere Wachstumsrate der Probe 199 beträgt 0,0179, die der Probe 233 beträgt 0,0184 und die der Probe 265 beträgt 0,0202. Anhand der berechneten Wachstumsraten konnten mit folgender Formel die Generationszeiten der drei Proben bestimmt werden:

$$\text{Generationszeit} = \frac{\ln 2}{k}$$

Daraus ergibt sich, dass sich im Knochenmark der NSG-Mäuse die Anzahl der Zellen der Probe 199 alle 38,5 Stunden, die der Probe 233 alle 37,5 Stunden und die Zellen der Probe 265 alle 34,2 Stunden verdoppelte. Bei diesen Werten muss berücksichtigt werden, dass sie sich aus den Faktoren Zellteilung, Zellruhe, Zelltod und Auswanderung der Zellen in andere Kompartimente zusammensetzen, welche nicht voneinander unterschieden werden können.

Etwa 17 Tage nach Zellinjektion verlassen die Xenograftzellen im Knochenmark die exponentielle Wachstumsphase und ihre Zellzahl nimmt langsamer zu (Abbildung 20). Das exponentielle Wachstum der Xenograftzellen im Knochenmark setzte sich also nicht über den gesamten Verlauf der Leukämie fort. Die Gesamtzellzahl des isolierten Knochenmarks betrug etwa 4×10^9 Zellen. Zum Zeitpunkt 17 Tage nach Zellinjektion wurden zwischen 1×10^4 und 5×10^7 Xenograftzellen im Knochenmark nachgewiesen. Daher begann die Reduktion der Wachstumsrate der Xenograftzellen in Knochenmark bereits zu einem Zeitpunkt, an dem weniger als 1 % aller Zellen im Knochenmark Xenograftzellen waren.

Um das Wachstumsverhalten der Xenograftzellen im Knochenmark genauer zu analysieren, wurden Modelle für exponentielles sowie logistisches Wachstum von Dr. Jan Hasenauer des Instituts für Computational Biology (ICB) des Helmholtz-Zentrum Münchens mit den Daten aus Abbildung 20 überlagert (Abbildung 21).

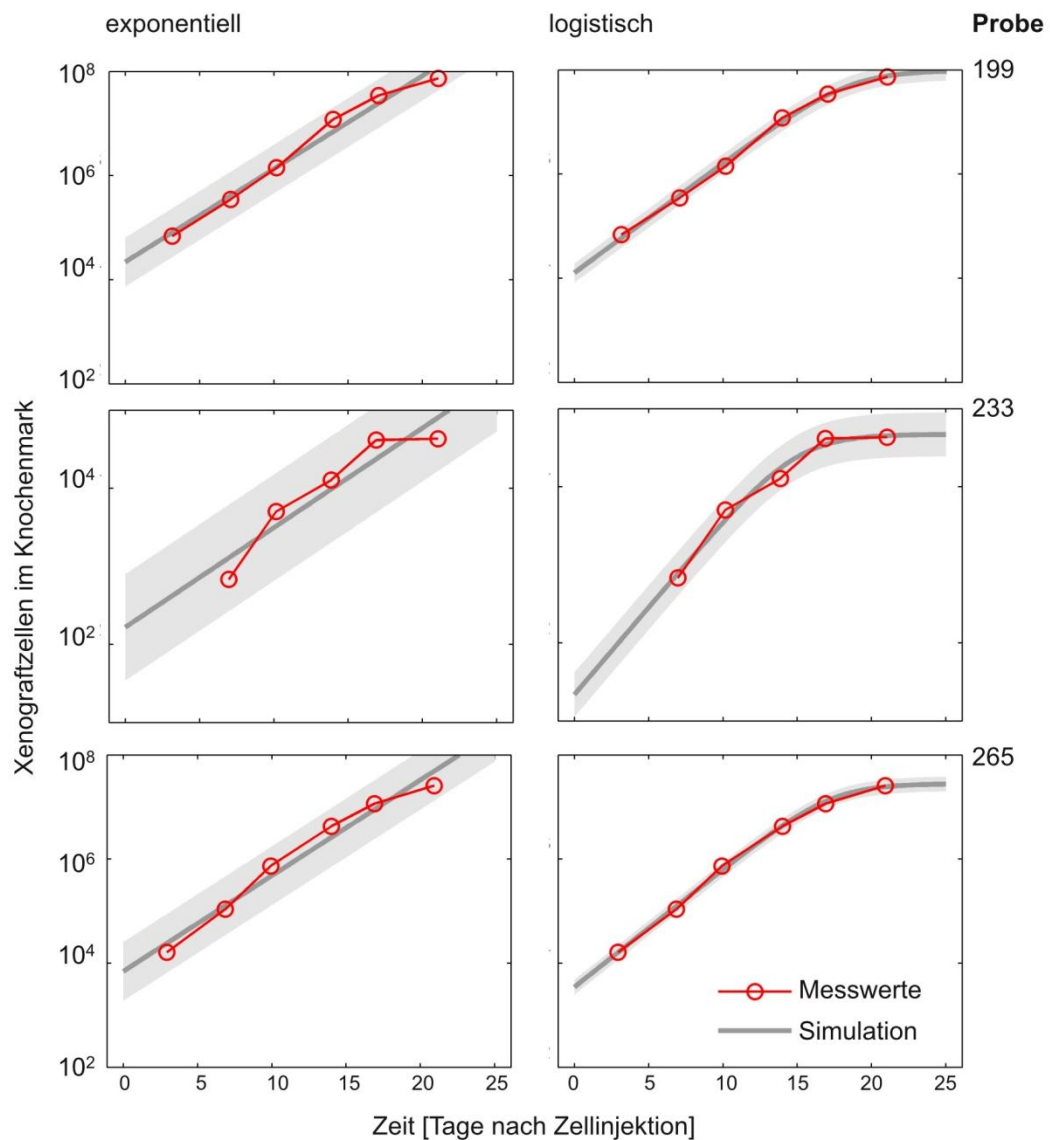


Abbildung 21: Überlagerung von Wachstumsmodellen

Überlagerung von Modellen für exponentielles sowie logistisches Wachstum an die Zellzahlen der zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus dem Knochenmark von NSG-Mäusen isolierten Xenograftzellen der Proben 199, 233 und 265. Die Überlagerungen wurde von Dr. Jan Hasenauer des Instituts für Computational Biology (ICB) des Helmholtz-Zentrum Münchens durchgeführt.

In Abbildung 21 ist zu sehen, dass nach dem Überlagern des logistischen Modells (Grafiken rechts) bei allen drei Proben der graue Bereich deutlich kleiner ist, als bei der Verwendung eines exponentiellen Modells (Grafiken links). Dieser graue Bereich stellt das Intervall dar, in dem unter Berücksichtigung von Messabweichungen, alle gemessenen Werte liegen müssten, um dem jeweiligen Modell zu entsprechen. Je kleiner das grau dargestellte Intervall ist, desto

weniger Abweichungen der Messpunkte von der Ideallinie werden akzeptiert und desto genauer ist die Beschreibung der realen Messpunkte durch das Modell. Das Modell des logistischen Wachstums entspricht daher den gemessenen Daten in allen drei Fällen besser, als das exponentielle Modell.

Um das proliferative Verhalten der Xenograftzellen zu untersuchen, wurden die Zellen vor ihrer intravenösen Injektion in NSG-Mäuse mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff 5-(6)-Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester (CFSE) markiert (4.5.6). Dieser Farbstoff wurde bereits erfolgreich dazu verwendet die Zellteilung von Lymphozyten *in vitro* zu analysieren (Lyons und Parish 1994, Parish 1999) und über mehrere Wochen bis Monate ruhende hämatopoetische Stammzellen in einem syngenem Mausmodell *in vivo* nachzuweisen (Takizawa, Regoes et al. 2011), wodurch gezeigt wurde, dass CFSE *in vivo* sehr stabil ist.

Um zu bestätigen, dass ein Verlust des CFSE-Signals in Xenograftzellen mit Zellteilung einhergeht, wurde eine Doppeltmarkierung von ALL-Xenograftzellen mit CFSE und BrdU, einem Standardmarker zur Messung von Proliferation, durchgeführt. Dazu wurde einer NSG-Maus, in welche 33 Tage zuvor 10 Millionen transgene 199-Zellen injiziert wurden, sieben Tage lang kontinuierlich BrdU über das Trinkwasser verabreicht (4.6.8). Anschließend wurden die Xenograftzellen aus der Milz des Tieres isoliert, mit CFSE gefärbt und das CFSE-Signal sowie der Einbau von BrdU gemessen (4.5.5; Abbildung 22). 10 Millionen der isolierten, doppelt markierten Zellen wurden wiederum in eine NSG-Maus injiziert. 14 Tage nach der Injektion wurden die Xenograftzellen aus dem Knochenmark des Tieres isoliert (5.2) und das CFSE-Signal sowie das Signal der BrdU-Inkorporation analysiert (4.5.5) und mit den Signalen der frisch gefärbten Zellen verglichen (Abbildung 22). Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, verlieren die nach 14 Tagen aus dem Knochenmark isolierten Zellen im Vergleich zu den frisch markierten Zellen beide Signale, weshalb der Verlust des CFSE-Signals mit einem Verlust des BrdU-Signals einhergeht.

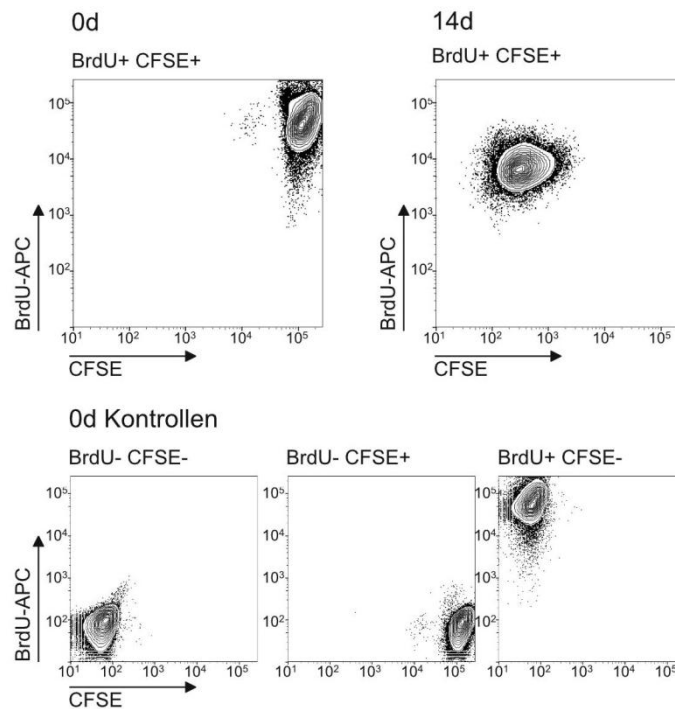


Abbildung 22: Doppelfärbung mit BrdU und CFSE.

Durchflusszytometrische Analyse von transgenen 199-Zellen, welche sowohl BrdU eingebaut haben als auch mit CFSE markiert wurden. Die Zellen wurden umgehend nach ihrer Markierung (0d) und 14 Tage danach (14d) gemessen. Zusätzlich wurden unterschiedliche Färbekontrollen gemessen (0d Kontrollen).

Nachdem die Eignung von CFSE als proliferativer Marker für ALL-Xenograftzellen gezeigt wurde, wurden von allen drei generierten dreifach transgenen ALL-Proben 10 Millionen Zellen intravenös in NSG-Mäuse injiziert, nachdem diese zuvor mit CFSE markiert wurden. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion wurden die Xenograftzellen aus dem Knochenmark isoliert und das CFSE-Signal der isolierten Zellen analysiert. Die Zunahme der Xenograftzellen der Probe 265 im Knochenmark der Tiere steht in einem linearen Zusammenhang mit der Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität des CFSE-Signals der Zellen (Abbildung 23). Dieser Zusammenhang bestätigt, dass CFSE zum Nachweis der Proliferation von Xenograftzellen verwendet werden kann, wie es bereits durch die doppelte Markierung von Zellen der Probe 199 mit BrdU und CFSE nachgewiesen wurde.

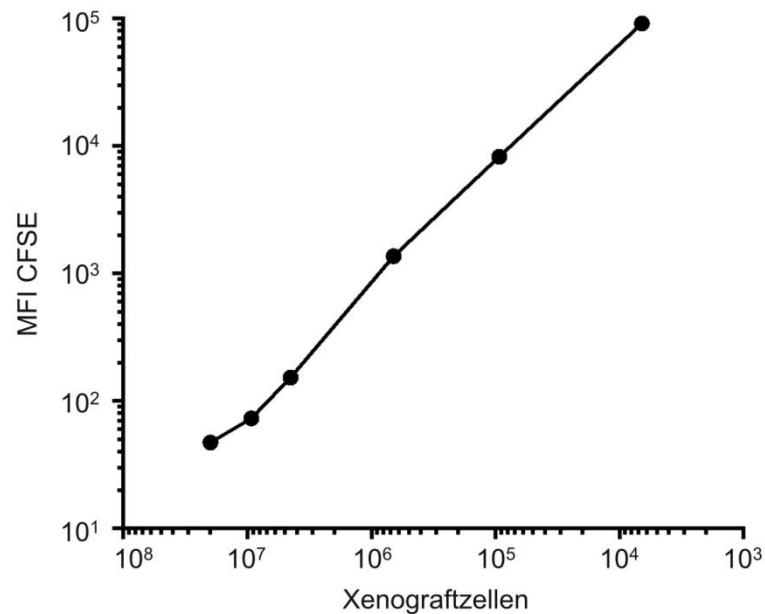


Abbildung 23: Korrelation von CFSE-Signal und Zellzahl

Auftragung der Zellzahl gegen die MFI des CFSE-Signals von zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus dem Knochenmark von NSG-Mäusen isolierten 265-Zellen. MFI CFSE gibt den Mittelwert des CFSE-Signals der gemessenen Gesamtpopulation an.

Betrachtet man den Verlust des CFSE-Signals in den Xenograftzellen im zeitlichen Verlauf in einer Darstellung als Punktauftragung (Abbildung 24), ist zu sehen, dass sich ein Großteil der im Knochenmark vorhandenen Xenograftzellen sehr schnell teilte und sein CFSE-Signal dadurch verlor. Ein kleiner Anteil von Xenograftzellen allerdings teilte sich nur sehr selten oder gar nicht, erkennbar am stetig hohen CFSE-Signal. Diese heterogene CFSE-Verteilung der Zellen bestand selbst noch nach 21 Tagen, was bei den Proben 199 und 265 der Hälfte und bei Probe 233 ein Drittel der Lebensspanne einer injizierten Maus entsprach (Tabelle 10).

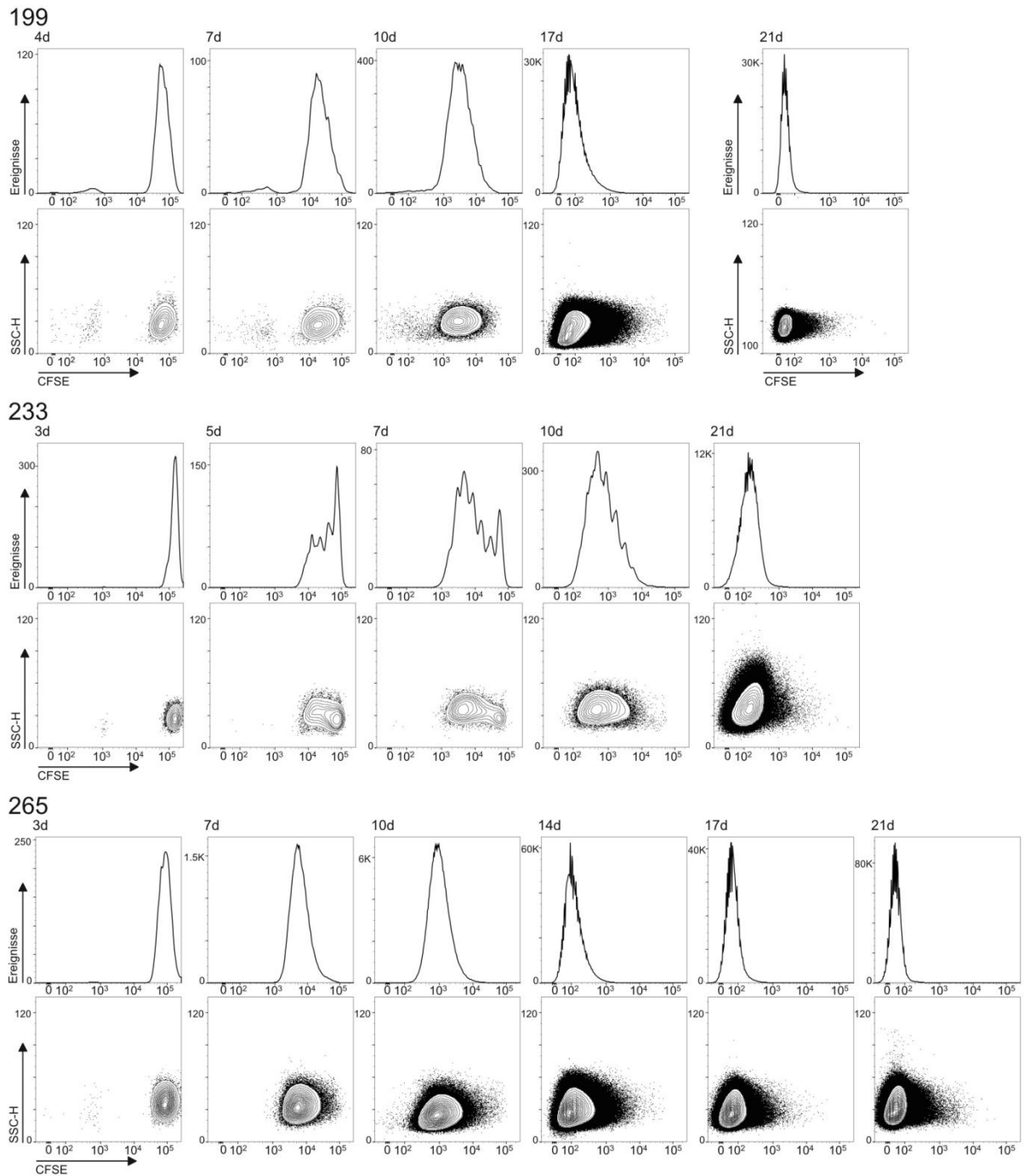


Abbildung 24: CFSE-Kinetiken der Proben 199, 233 und 265.

Durchflusszytometrische Analyse des CFSE-Signals der zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus dem Knochenmark von NSG-Mäusen isolierten Xenograftzellen. K = kilo, entspricht 1000x.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass nach der Injektion von Zellen aller verwendeten ALL-Xenograftproben in NSG-Mäuse nur ein Teil der Zellen dazu in der Lage war, im Knochenmark anzuwachsen. Die dort anwachsenden Zellen expandieren anschließend für die Dauer von bis zu 17 Tagen exponentiell. Nach 17 Tagen reduzierte sich das Wachstum der Zellen im Knochenmark,

wodurch die Zellen für die gesamte Dauer des beobachteten Zeitraums von 21 Tagen ein logistisches Wachstumsverhalten aufwiesen. Wurden die Xenograftzellen vor ihrer Injektion mit CFSE gefärbt, wurde nach ihrer Isolierung zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion festgestellt, dass die Zellen unterschiedliche CFSE-Intensitäten aufwiesen. Somit wurde gezeigt, dass die im Knochenmark von NSG-Mäusen wachsenden Xenograftzellen der in dieser Arbeit verwendeten Proben eine heterogene Population aus sich unterschiedlich schnell teilenden Zellen darstellt.

5.4. Identifizierung und Charakterisierung von sich unterschiedlich schnell teilenden ALL-Xenograftzellen

Im vorherigen Kapitel wurde das Wachstumsverhalten von ALL-Xenograftzellen bis 21 Tage nach ihrer Transplantation im Knochenmark von NSG-Mäusen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass Xenograftzellen, wenn sie vor ihrer Transplantation mit CFSE markiert wurden, nach ihrer Isolierung aus dem Knochenmark eine heterogene Verteilung des Fluoreszenzsignales aufwiesen. Dem zur Folge teilen sich die Xenograftzellen im Knochenmark einer Maus unterschiedlich häufig. Daher wurde versucht, die Xenograftzellen, entsprechend ihres CFSE-Signals in sich schnell und sich langsam teilende Zellen zu untergliedern. Die Eigenschaften der Zellen aus beiden Fraktionen wurden im Anschluss untersucht und mit einander bezüglich des Spontanwachstums, der Ursachen des Wachstumsunterschiedes und der LIC-Frequenz verglichen.

5.4.1. Verhalten von LRC und LLCs während der Entwicklung der Leukämie

Das erste Ziel war es, eine Fraktion von sich selten teilenden Zellen und sich häufig teilenden Zellen zu definieren und deren Verhalten im Verlauf der Zeit zu verfolgen. In normalen Lymphozyten können einzelne Zellteilungen anhand von unterschiedlichen Höhepunkten des CFSE-Signals festgestellt werden (Lyons und Parish 1994). Auf Grund der Heterogenität der Zellgröße der Xenograftzellen ist eine Unterteilung in einzelne Zellteilungen durch das CFSE-Signal nicht möglich. Um heterogen wachsende Xenograftzellen dennoch nach ihrem Proliferationsverhalten in unterschiedliche Subfraktionen aufzuteilen, wurde die Intensität des CFSE-Signales in Halbierungen der mittleren Fluoreszenzintensität

(MFI) aller Zellen unterteilt (Abbildung 25). Als höchste Intensität wurde dabei die MFI des CFSE-Signals von allen Zellen gewählt, welche drei Tage nach ihrer Injektion aus dem Knochenmark einer NSG-Maus isoliert wurden. Der Wert der MFI des CFSE-Signals dieser Zellen wird mit „0“ für „keine Halbierungen des Signales“ angegeben. Jede weitere Halbierung des CFSE-Signals wurde fortlaufend nummeriert, wobei „1“ einer „einmaligen Halbierung des Signals“ entspricht usw. (gestrichelte Linien in Abbildung 25).

Durch eine Unterteilung der CFSE-Intensität bis zu sieben Halbierungen wurden gemessene Zellpopulationen in unterschiedliche Fraktionen unterteilt. Zellen, welche ein CFSE-Signal aufwiesen, welches maximal drei Halbierungen der mittleren Fluoreszenz des CFSE-Signals entsprach, werden als markierungsbewahrende Zellen bezeichnet (englisch: „label retaining cells“, LRCs). Selbst 21 Tage nach der Injektion von Zellen aller drei in dieser Arbeit verwendeten Proben konnten noch LRCs im Knochenmark von NSG-Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 25 und Abbildung 27). Diese Zellen proliferierten langsam oder teilten sich seit ihrer Injektion gar nicht.

Bei einer weiteren Fraktion handelte es sich um Zellen, welche eine CFSE-Intensität aufwiesen, die mehr als sieben Halbierungen der mittleren Fluoreszenz an Tag 3 nach Zellinjektion entspricht. Diese Zellen machten nach einiger Zeit den Großteil der Xenograftzellen aus und wurden als markierungsverlierende Zellen (englisch „label losing cells“, LLCs) bezeichnet. Bei diesen Zellen handelte es sich um schnell proliferierende Zellen, da sie zum Teil bereits 14 Tage nach ihrer Injektion ihr gesamtes CFSE-Signal verloren hatten (Abbildung 24 und Abbildung 27).

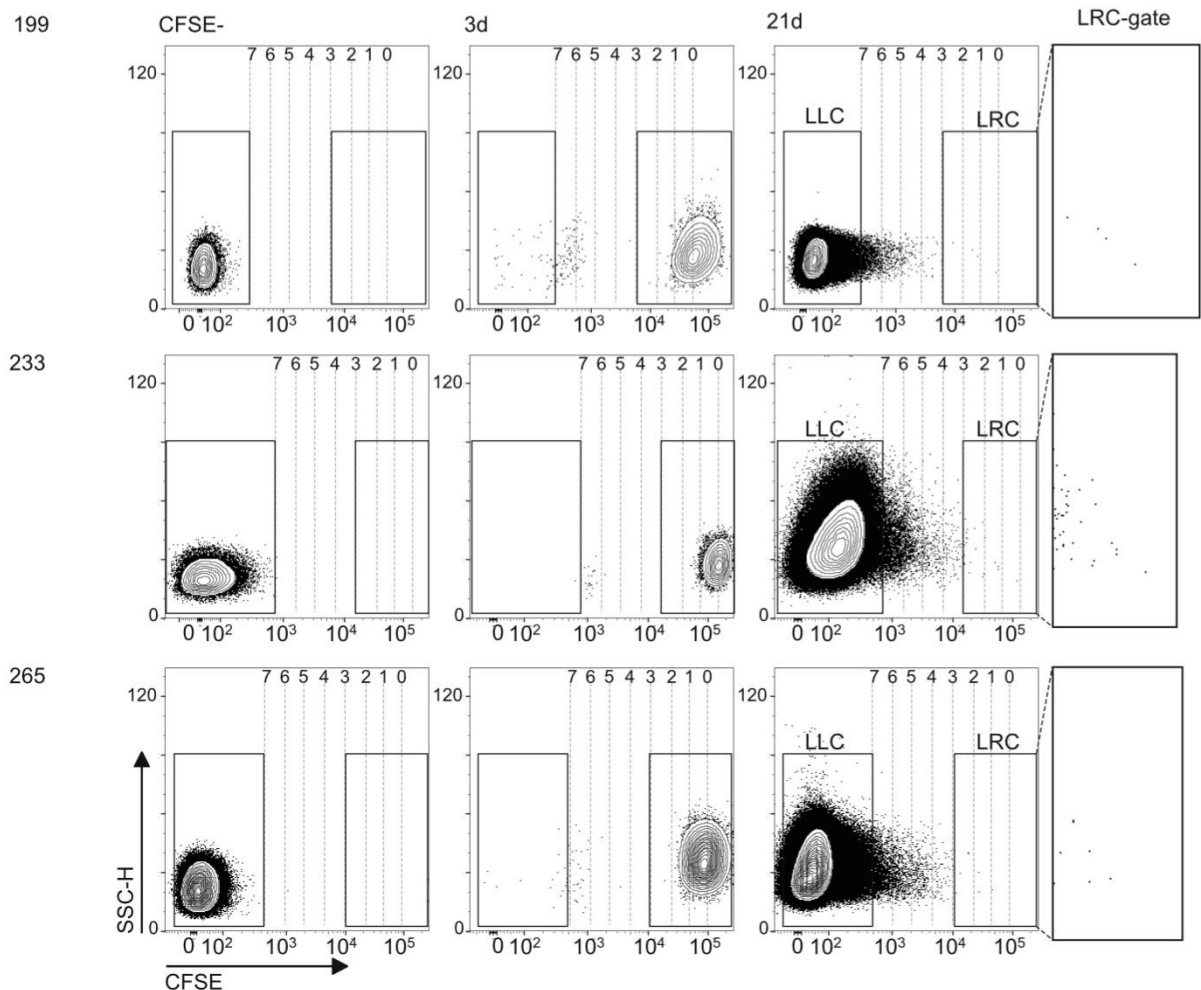


Abbildung 25: Unterscheidung zwischen LRCs und LLCs

Durchflusszytometrische Analysen von Xenograftzellen der drei in dieser Arbeit verwendeten Proben. Die linke Darstellung zeigt die Autofluoreszenz von Zellen, welche aus der Milz isoliert und nicht mit CFSE gefärbt wurden (CFSE-). Die mittlere Darstellung zeigt Zellen, welche drei Tage nach Färbung mit CFSE und Injektion in eine NSG-Maus aus dem Knochenmark des Tieres isoliert wurden. Die rechte Darstellung zeigt Zellen, welche 21 Tage nach Färbung und Injektion wieder aus dem Knochenmark isoliert wurden. In jeder Teilabbildung definiert das linke Gate Zellen, deren mittlere CFSE-Fluoreszenz (MFI-CFSE) bereits mehr als sieben Mal halbiert wurde (LLC), das rechte Gate umfasst Zellen, deren MFI-CFSE sich maximal dreimal halbiert hat (LRC).

Aufgrund der graphischen Limitierung der verwendeten Software können nicht alle gemessenen Ereignisse dargestellt werden, weshalb die in dem LRC-gate dargestellten Punkte nicht der absoluten Zahl der gemessenen Ereignisse entspricht. Die absolute Anzahl der detektierten LRCs sowie der prozentuale Anteil der gemessenen Ereignisse sind in Abbildung 27 und Abbildung 26 dargestellt.

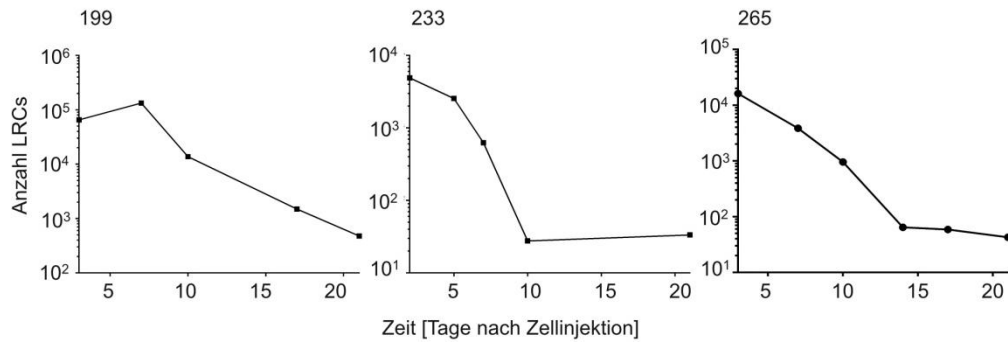


Abbildung 26: Anzahl LRCs

Anzahl der im Knochenmark detektierten LRCs im Verlauf der Zeit. Die Zellen wurden in dem Knochenmark von Tieren detektiert, welche zuvor mit 10 Millionen CFSE-gefärbten Zellen der Probe 199, 233 und 265 intravenös injiziert wurden.

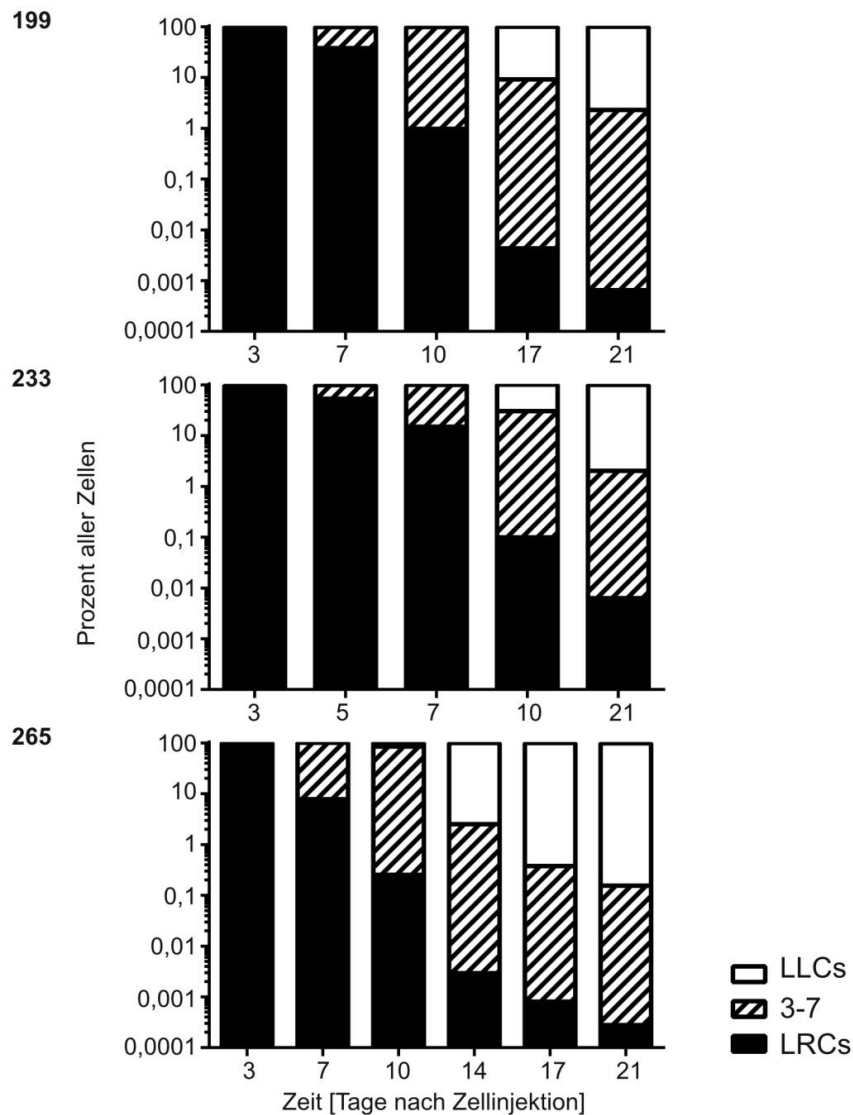


Abbildung 27: Anteil der LRCs im zeitlichen Verlauf

Prozentualer Anteil von LRCs sowie Zellen, deren CFSE-Intensität drei bis sieben Halbierungen oder mehr als sieben Halbierungen (LLC) entsprach, zu unterschiedlichen Zeitpunkten aller drei verwendeten Xenograftproben.

Zusammenfassend konnte eine Fraktion von sich selten teilenden ALL-Xenograftzellen (LRCs) und eine Fraktion von sich häufig teilenden Zellen (LLCs) definiert und ihr Verhalten während der Entwicklung der Leukämie beschrieben werden.

5.4.2. Wachstumsverhalten wird von äußeren Einflüssen bestimmt

Ziel des nächsten Schrittes war es, zu ermitteln, welche Umstände die Wachstumsgeschwindigkeiten von LRCs und LLCs beeinflussten. Für die Entstehung des heterogenen Wachstums von ALL-Xenograftzellen im Knochenmark von NSG-Mäusen gibt es mehrere Möglichkeiten. Zum Einen könnte die Population der Xenograftzellen, welche im Knochenmark der NSG-Mäuse wächst, aus unterschiedlichen Klonen zusammengestellt sein, welche unterschiedliche proliferative Eigenschaften aufweisen (intrinsischer Grund). Zum anderen könnte auch das Umfeld der Zellen im Knochenmark Einflüsse auf ihre proliferativen Eigenschaften haben (extrinsische Gründe).

Um der Ursache des heterogenen Wachstums nachzugehen, wurden Xenograftzellen der LLC-Fraktion der Proben 199 und 265 14 Tage nach ihrer Färbung isoliert (Abbildung 25), erneut mit CFSE gefärbt und intravenös einer NSG-Maus injiziert. Wiederum 14 Tage nach der Injektion wurden die Zellen erneut isoliert und ihre CFSE-Verteilung analysiert (Abbildung 28).

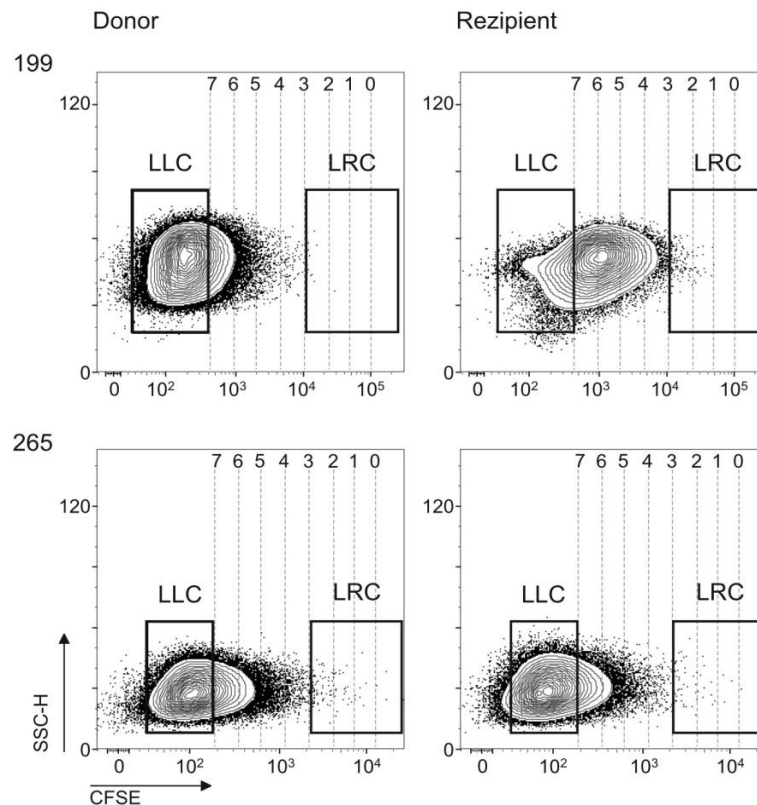


Abbildung 28: Retransplantation von LLCs.

Durchflusszytometrische Analyse von Zellen der Proben 199 und 265. Aus dem Knochenmark isolierte, zuvor CFSE gefärbte, Zellen (Donor) wurden auf LLCs sortiert. Die sortierten Zellen wurden erneut CFSE gefärbt, wiederum in eine Maus injiziert und 14 Tage später isoliert. Das CFSE-Signal der isolierten Zellen wurde analysiert (Rezipient).

In Abbildung 28 ist zu sehen, dass LLCs, nach einer erneuten CFSE-Färbung mit anschließender Transplantation, in der Lage sind, LRCs hervorzubringen und somit erneut ein heterogenes Wachstum auszubilden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das heterogene Wachstumsverhalten nicht durch unterschiedliche Subklone in der gleichen Probe zustande kam, sondern durch extrinsische Faktoren hervorgerufen wurde. Einerseits könnten diese Faktoren eine Mangelversorgung mit Nährstoffen oder Sauerstoff sein. Andererseits sind auch Zellinteraktionen, entweder mit anderen Xenograftzellen oder mit Zellen des Knochenmarks, eine mögliche Ursache für das heterogene Wachstumsverhalten der Xenograftzellen.

Zusammenfassend sind es also nicht zellautonome Faktoren, sondern Einflüsse des Umfeldes, die das proliferative Verhalten der ALL-Xenograftzellen im Knochenmark bestimmen.

5.4.3. LRCs haben keine höhere Stammzellfrequenz als LLCs

Die in dieser Arbeit beschriebene reduzierte Proliferation oder Zellruhe der LRCs ist eine Eigenschaft, welche mit Krebsstammzellen oder tumorinduzierenden Zellen in Verbindung gebracht wird. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, festzustellen, ob die LRC-Fraktion für leukämieinduzierende Zellen (englisch: „leukemia initiating cells“, LICs) angereichert ist. Um die Frequenz der LICs in der LRC-Fraktion mit der LIC-Frequenz der LLC-Fraktion zu vergleichen, wurden 10 Millionen Zellen aller drei hier generierten, dreifach transgenen ALL-Xenograftproben mit CFSE gefärbt und in NSG-Mäuse injiziert. Nach zehn Tagen wurden die Xenograftzellen aus dem Knochenmark der Tiere isoliert und unter Verwendung des CFSE-Signals nach LRCs und LLCs sortiert (Abbildung 25). Mit Zellen der beiden Fraktionen wurde anschließend eine parallele Transplantation von unterschiedlichen Verdünnungen der Zellen („limiting dilution transplantation assay“, LDTA) aus beiden Fraktionen durchgeführt. Dazu wurde von jeder der beiden sortierten Fraktionen jeweils eine Verdünnungsreihe angelegt und mehrere Aliquots jeder Verdünnungsstufe in jeweils ein Tier injiziert (Tabelle 13).

Tabelle 13: LDTA-Zellzahlen

	Zellzahl	Anzahl injizierter Tiere
199		
LRC	10	20
	100	7
	333	4
LLC	10	20
	100	5
	333	5
	1000	5
	3333	4
233		
LRC	33	3
LLC	33	5
	333	5
	1000	2
265		
LRCs	100	5
	333	2
LLC	100	5
	333	5
	1000	5
	3333	3

Da die Entwicklung der Leukämien, welche durch Zellen der LRC- und der LLC-Fraktion induziert wurden, über die Zeit verfolgt wurde, kann auch eine Aussage über die Wachstumsgeschwindigkeit von Leukämien, welche durch die beiden unterschiedlichen Fraktionen induziert wurden, getroffen werden.

Keines der Tiere, welches mit Zellen der Probe 233 transplantiert wurde, entwickelte eine Leukämie. Da die höchste transplantierte Zellzahl für diese Probe 1000 Zellen betrug, ist es wahrscheinlich, dass die LIC-Frequenz dieser Probe unter 1:1000 liegt. Da allerdings nicht mehr als 100 LRCs der Probe 233 isoliert werden konnten, konnte ein LDTA, welcher die LIC-Frequenz der LLCs mit der LIC-Frequenz der LRCs vergleicht, nicht durchgeführt werden.

Die Tiere, welche mit Zellen der Proben 199 und 265 injiziert wurden, wurden regelmäßig durch *in vivo*-Bildgebung analysiert und die entstandenen Signale

quantifiziert. Die Mittelwerte dieser Quantifizierungen jeder Gruppe von Tieren, welche mit der gleichen Zellzahl derselben Fraktion injiziert wurden, wurden gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 29 und Abbildung 30).

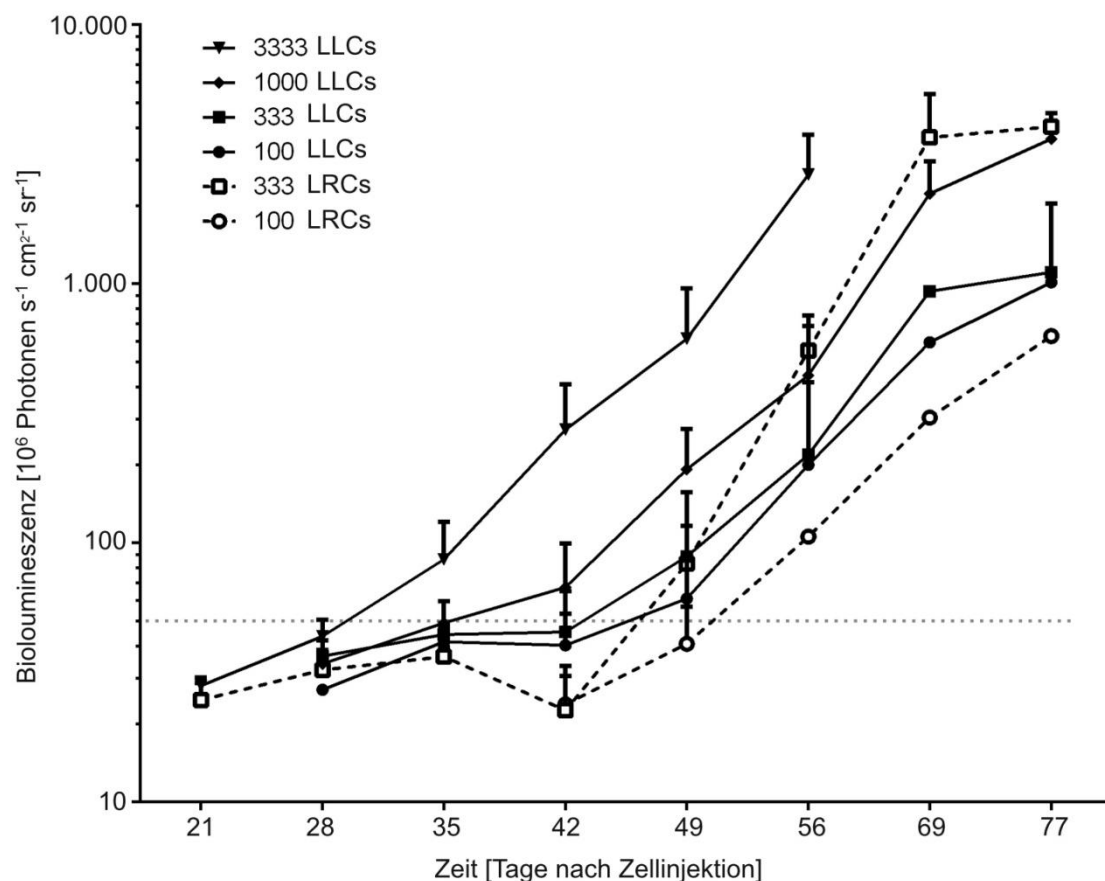


Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf des LDTAs der Probe 199.

Auftragung der Mittelwerte der Quantifizierungen der *in vivo*-Bildgebungssignale einer Gruppe von Tieren, welche die gleiche Anzahl von Zellen der Probe 199 der gleichen Fraktion erhalten haben, gegen die Zeit in Tagen nach Zellinjektion. Gefüllte Symbole, welche mit durchgezogenen Linien verbunden sind, geben Daten der LLCs an. Offene Symbole, welche mit gestrichelten Linien verbunden sind, geben Daten der LRCs an. Die gepunktete, graue Linie zeigt den Grenzwert an, ab dem ein Signal als positiv gewertet wird. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. ($n = 3$ bis 7)

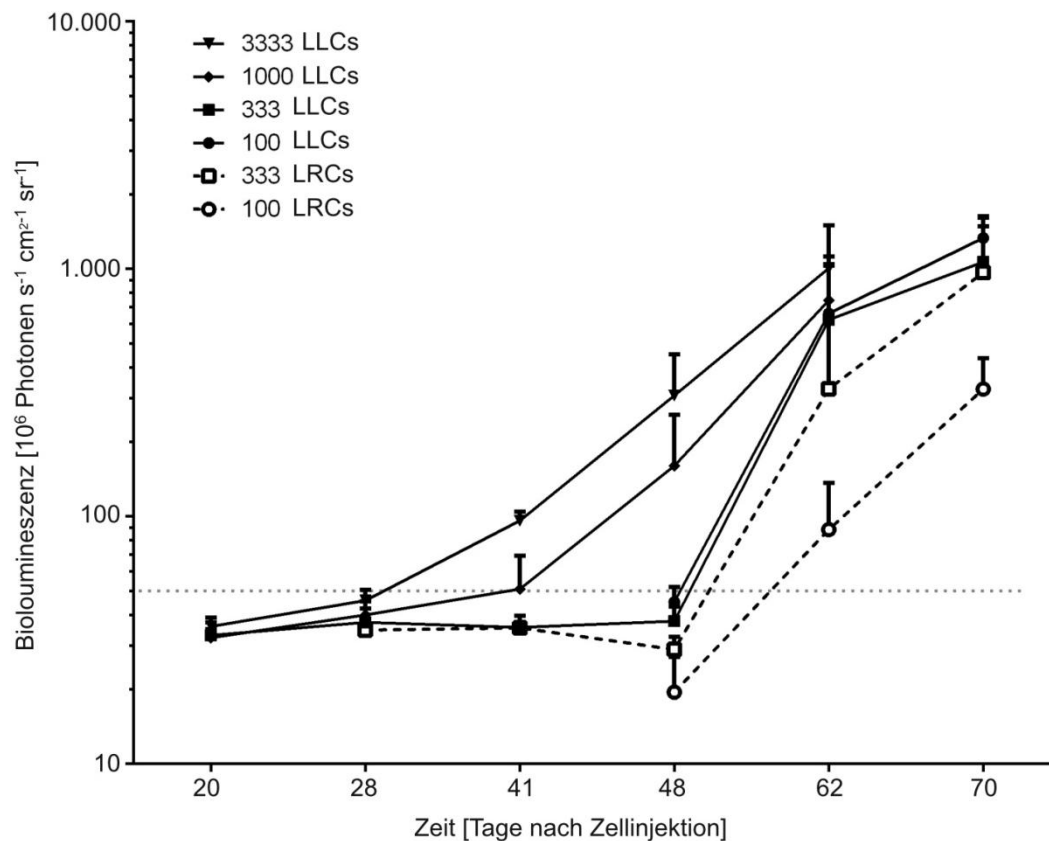


Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf des LDTAs der Probe 265.

Auftragung der Mittelwerte der Quantifizierungen der *in vivo*-Bildgebungssignale einer Gruppe von Tieren, welche die gleiche Anzahl von Zellen der Probe 265 der gleichen Fraktion erhalten haben, gegen die Zeit in Tagen nach Zellinjektion. Gefüllte Symbole, welche mit durchgezogenen Linien verbunden sind, geben Daten der LLCs an. Offene Symbole, welche mit gestrichelten Linien verbunden sind, geben Daten der LRCs an. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. ($n = 2$ bis 5)

Sowohl in Abbildung 29 als auch in Abbildung 30 ist zu sehen, dass Tiere der Gruppen, die LRCs erhalten hatten, zur gleichen Zeit beginnen, positive Signale aufzuweisen, wie die Tiere in jenen Gruppen, denen die gleiche Anzahl an LLCs injiziert worden war. Dem zur Folge sind LRCs ebenso wie LLCs in der Lage eine Leukämie hervorzurufen. Des Weiteren entwickelt sich die durch LRCs induzierte Leukämie nicht langsamer als eine von LLCs hervorgerufene Leukämie, obwohl die Zellen zum Zeitpunkt ihrer Isolierung langsamer gewachsen sind. LRCs sind also in der Lage, ebenso schnell proliferierende Zellen wie LLCs hervorzubringen. Bei einer Transplantation von je 10 Zellen der LRC-Fraktion oder der LLC-Fraktion in eines von insgesamt 20 Tieren je Fraktion zeigte sich, dass nach 75 Tagen in beiden Gruppen jeweils acht der injizierten Tiere eine

Leukämie entwickelt hatten (Abbildung 31). Alle anderen Tiere zeigten auch zu zwei späteren Zeitpunkten keine Signale von Leukämie bei *in vivo*-Bildgebungsanalysen. Eines der Tiere, welche mit 10 Zellen der LLC-Fraktion injiziert wurden, musste 65 Tage nach Zellinjektion aus nicht mit Leukämie verbundenen Gründen abgetötet werden. In dem Tier konnten keine Xenograftzellen gefunden werden, weshalb es als „nicht angewachsen“ in die Auswertung mit einfließt. Die LRC-Fraktion weist hier also die gleiche LIC-Frequenz auf wie die LLC-Fraktion.

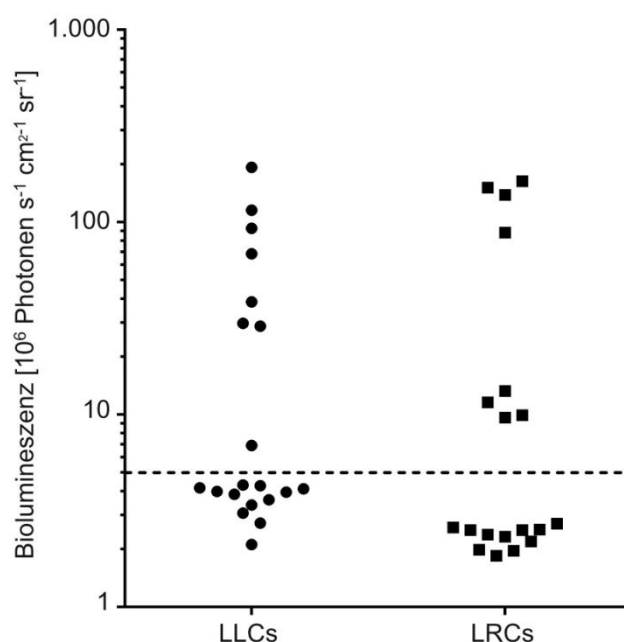


Abbildung 31: LIC-Frequenz 199 von zehn transplantierten Zellen.

LIC-Frequenz von zehn transplantierten Zellen der LRC-Fraktion und der LLC-Fraktion 75 Tage nach Zellinjektion. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier. Die gestrichelte Linie gibt die Grenze an, ab wann ein Tier als angewachsen gewertet wird.

Zur genaueren Bestimmung der LIC-Frequenzen beider Fraktionen wurden die Werte für die Anzahl der transplantierten Zellen und die Information, wie viele Tiere der jeweiligen Gruppe eine Leukämie entwickelt hatten, aller Verdünnungen der LDTAs der Probe 199 und 265, wie sie in Tabelle 13 aufgeführt sind, in die Online-Software ELDA eingespeist (Hu und Smyth 2009), welche dazu verwendet wird, Stammzellfrequenzen zu ermitteln. Diese Analyse wurde zu jedem Zeitpunkt der *in vivo*-Bildgebung durchgeführt, um die Entwicklung der LIC-Frequenz im Verlauf der Zeit zu ermitteln (Abbildung 32 und Abbildung 33). Sobald die LIC-Frequenz sich dreimal in Folge nicht veränderte

wurden alle Tiere, welche bisher keine Leukämie entwickelt hatten, als nicht angewachsen gewertet.

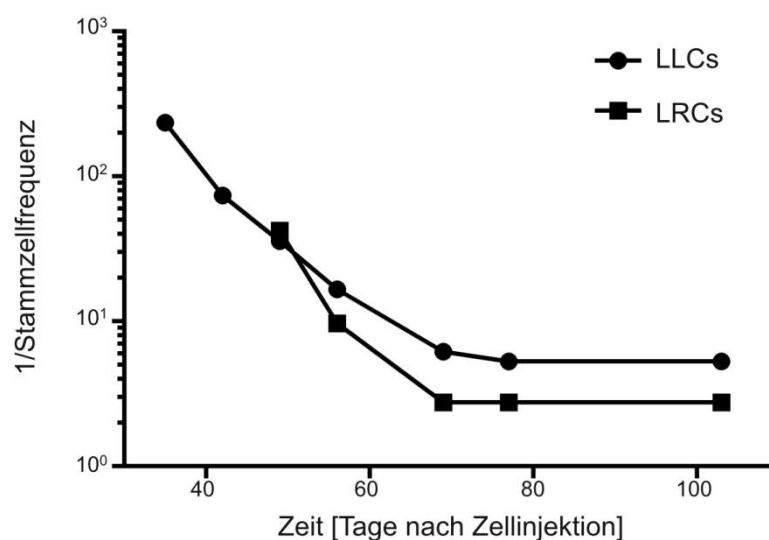


Abbildung 32: LIC-Frequenz der Probe 199.

Bestimmung der LIC-Frequenz der LRC-Fraktion und der LLC-Fraktion der Probe 199 im Verlauf der Zeit. Die Frequenz zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde mittels der Online-Software ELDA bestimmt.

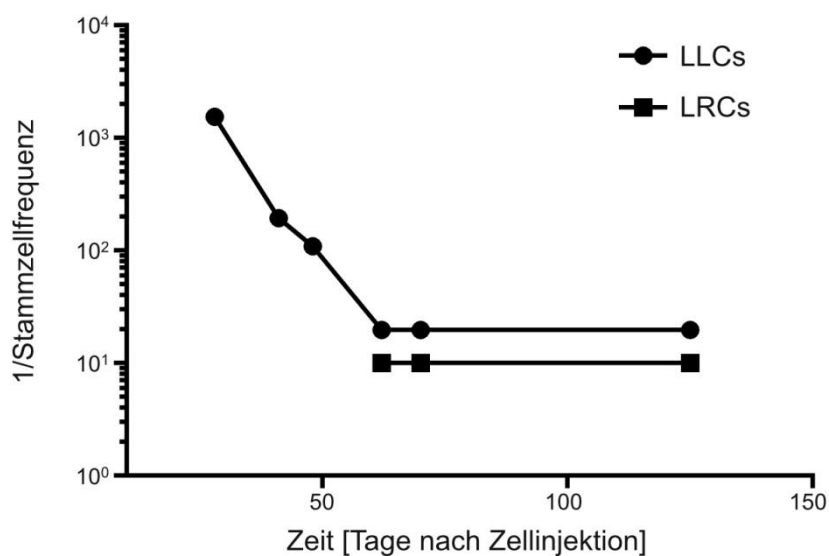


Abbildung 33: LIC-Frequenz der Probe 265.

Bestimmung der LIC-Frequenz der LRC-Fraktion und der LLC-Fraktion der Probe 265 im Verlauf der Zeit. Die Frequenz zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde mittels der Online-Software ELDA bestimmt.

Abbildung 32 und Abbildung 33 kann entnommen werden, dass sich sowohl in Probe 199, als auch in Probe 265, die LIC-Frequenz in der LRC-Population um

weniger als Faktor zwei von der LIC-Frequenz der LLC-Fraktion unterscheidet. Somit besteht kein signifikanter Unterschied der LIC-Frequenz zwischen der LRC-Fraktion und der LLC-Fraktion.

Die Methode zur Bestimmung der LIC-Frequenz anhand von *in vivo*-Bildgebung hat gegenüber der herkömmlichen Bestimmung der LIC-Frequenz große Vorteile. Bei der üblichen Methode zur Bestimmung der LIC-Frequenz werden alle Tiere zu einem bestimmten Zeitpunkt getötet und durch Analyse der Organe festgestellt, ob die Tiere einen Tumor entwickelt hatten. Bei dieser Vorgehensweise kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass ein Tier, welches zum Zeitpunkt der Auswertung keinen nachweisbaren Tumor aufwies, nicht zu einem späteren Zeitpunkt einen Tumor entwickelt hätte. Die auf *in vivo*-Bildgebung basierende Methode erlaubt dagegen eine verlässliche Aussage, ohne die Tiere zu töten. Dadurch kann die Analyse zu einem späteren Zeitpunkt mit den gleichen Tieren erneut durchgeführt werden.

Bei der Durchführung von LDTAs mit Zellen der LLC- und der LRC-Fraktion der Proben 199 und 265 zeigte sich, dass die induzierten Leukämien sich gleich schnell entwickelten, unabhängig von welcher Zellfraktion sie induziert wurden. Des Weiteren unterschied sich die LIC-Frequenz der beiden Fraktionen der gleichen Probe nicht. Somit war es nicht möglich, bei den in dieser Arbeit verwendeten ALL-Xenograftproben LICs auf Grund ihrer proliferativen Eigenschaften anzureichern.

Zusammengefasst wurde eine Methode zur Unterscheidung von Xenograftzellen in eine sich schnell teilende LLC-Fraktion und eine sich langsam teilende LRC-Fraktion anhand ihres CFSE-Signales vorgestellt. Zellen beider Fraktion wurden erfolgreich isoliert und retransplantiert. Dabei zeigte sich, dass Faktoren des Umfeldes und nicht zellautonome Faktoren das proliferative Verhalten beeinflussen. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die LRC-Fraktion nicht für LICs angereichert ist.

5.5. Die Apoptose-Sensitivität unterschiedlich proliferierender Xenograftzellen variiert *in vivo* aber nicht *in vitro*

Durch die in Kapitel 5.4. dargestellten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass im Knochenmark von NSG-Mäusen sowohl sich schnell teilende LLC- als auch sich langsam oder sogar überhaupt nicht teilende LRC-Xenograftzellen auftreten. Da es Hinweise auf eine Verbindung zwischen einer Reduktion der Proliferation in Krebszellen mit einer Resistenz gegenüber Chemotherapie gibt (Moore, Houghton et al. 2012), wurde im Folgenden untersucht und verglichen, wie sich die Apoptosesensitivität von LLCs gegenüber der von LRCs nach Stimulierung mit konventionellen Chemotherapeutika, wie sie in der Klinik zur Behandlung von ALL verwendet werden, verhält. Bei den in diesem Kapitel gezeigten Studien wurden lediglich die Proben 199 und 265 verwendet, da bei Probe 233 nicht genügend LRCs isoliert werden konnten, um die Experimente durchzuführen.

5.5.1. Kein Unterschied der Apoptose-Sensitivität von unterschiedlich proliferierenden Xenograftzellen *in vitro*

Da nachgewiesen wurde, dass sich das proliferative Verhalten von Krebszellen auf deren Apoptosesensitivität auswirkt (Moore, Houghton et al. 2012), wurde untersucht, ob ein Unterschied in der Apoptosesensitivität zwischen den Zellen der LRC-Fraktion und den Zellen der LLC-Fraktion der Proben 199 und 265 besteht. In einem ersten Schritt wurde die Apoptose-Sensitivität von Zellen beider Fraktionen *in vitro* untersucht. Dazu wurden zunächst Chemotherapeutika ermittelt, welche in allen Zellen der beiden Proben Apoptose induzieren. Hierfür wurden die transgenen Xenograftzellen mit Wirkstoffen in den in Tabelle 14 aufgeführten Endkonzentrationen stimuliert. Die Konzentrationen der Chemotherapeutika richteten sich dabei an in Patienten gemessenen höchsten Plasmawerten für die jeweilige Substanz.

Tabelle 14: Verwendete Zytostatika

Zytostatikum	Abkürzung	Konzentration	Quelle
<i>In vitro</i>			
Amsacrin	AMS	18 µM	(Paxton, Kim et al. 1990)
Daunorubicin	DAU	0,25 µM	(Estlin, Ronghe et al. 2000)
Doxorubicin	DOX	0,5 µM	(Estlin, Ronghe et al. 2000)
Epirubicin	EPI	0,5 µM	(Lunardi, Vannozzi et al. 2003)
Etoposid	ETO	30 µM	(Hande, Wedlund et al. 1984)
Mitoxantron	MIT	0,675 µM	(Civalleri, Vannozzi et al. 2002)
Vincristin	VCR	0,3 µM	(Embree, Gelmon et al. 1998)
<i>in vivo</i>			
Doxorubicin	DOX	5 mg/kg	(Huynh, Chow et al. 2007, Ehrhardt, Schrembs et al. 2011)
Etoposid	ETO	50 mg/kg	(Terziyska, Alves et al. 2012)
Mitoxantron	MIT	1,5 mg/kg	(Wiedemann, Mella et al. 1992, An, Wu et al. 2011)
Vincristin	VCR	2 mg/kg	(Ogawa, Mimura et al. 2001, Ehrhardt, Schrembs et al. 2011)

48 Stunden nach der Inkubation der Zellen mit den unterschiedlichen Substanzen wurden diese mit DAPI gefärbt und im Fall von Probe 199 eine Annexin V-Färbung durchgeführt, worauf die Proben im Durchflusszytometer analysiert und die spezifische Apoptoserate bestimmt wurde (4.5.2, Abbildung 34).

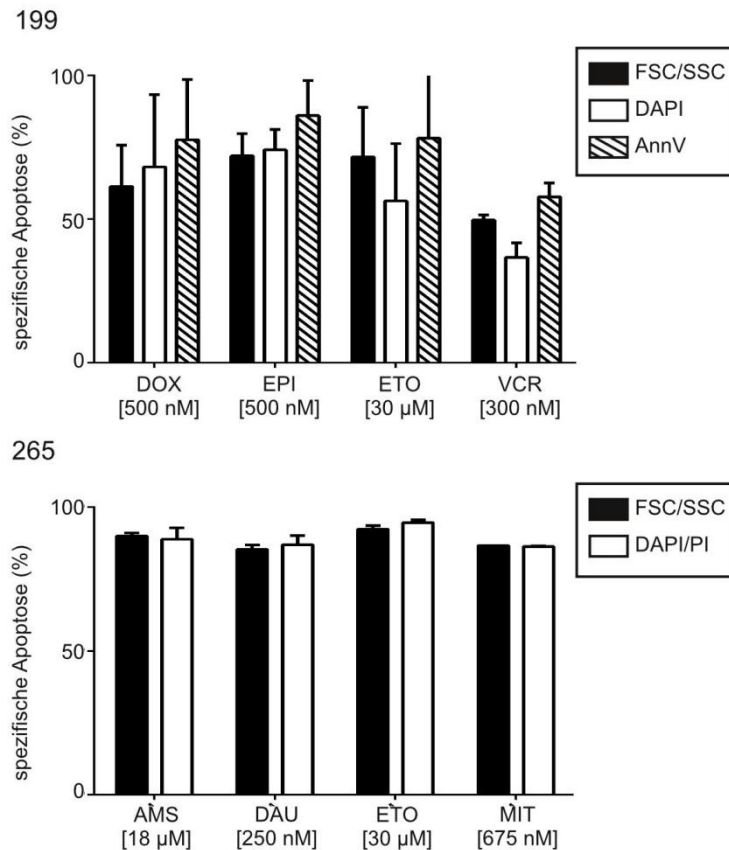


Abbildung 34: Apoptose-Sensitivität der Proben 199 und 265.

Induktion von spezifischer Apoptose in Zellen der Proben 199 und 265 durch unterschiedliche Wirkstoffe. Die Apoptose der Probe 199 wurde mittels FSC/SSC-Analyse, DAPI-Färbung und Annexin V-Färbung ermittelt, die der Probe 265 mittels FSC/SSC-Analyse und DAPI-PI-Doppelfärbung. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. (n=3)

Wie in Abbildung 34 zu sehen ist, induzieren die verwendeten Substanzen in den eingesetzten Konzentrationen spezifische Apoptose von mindestens 50 % in den Zellen der beiden ALL-Xenograftproben. Da die Zellen der beiden Proben sensitiv gegenüber den eingesetzten Substanzen waren, wurden diese für weitere Experimente in dieser Arbeit verwendet.

Zum Vergleich der Apoptosesensitivität der Zellen der LRC-Fraktion mit der Sensitivität der Zellen der LLC-Fraktion wurden zunächst 10 Millionen CFSE-gefärbte Zellen der Proben 199 und 265 zehn Tage nach Injektion aus dem Knochenmark von NSG-Mäusen isoliert. Die isolierten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf Grund ihres CFSE-Signals in LLC- und LRCs sortiert. Nach dem Sortieren wurden von jeder der beiden Fraktionen gleich viele Zellen in die Kavitäten einer 384-Well-Platte in 100 µl Patientenmedium+ ausgesät. Trotz der geringen Zellzahl in der LRC-Fraktion beider Proben (5.4) wurden nie

weniger als 500 Zellen je Kavität ausgebracht. Anschließend wurde der Inhalt von je drei Kavitäten mit der gleichen Konzentration derselben Substanz stimuliert. 48 Stunden nach der Stimulierung wurde der gesamte Inhalt der Kavitäten mit DAPI und PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (4.5.5). Der Anteil der für DAPI und PI positiven, und somit toten, Zellen wurde in den stimulierten Kavitäten sowie in den Kontrollkavitäten bestimmt und daraus die spezifische Apoptose berechnet (4.5.2, Abbildung 35).

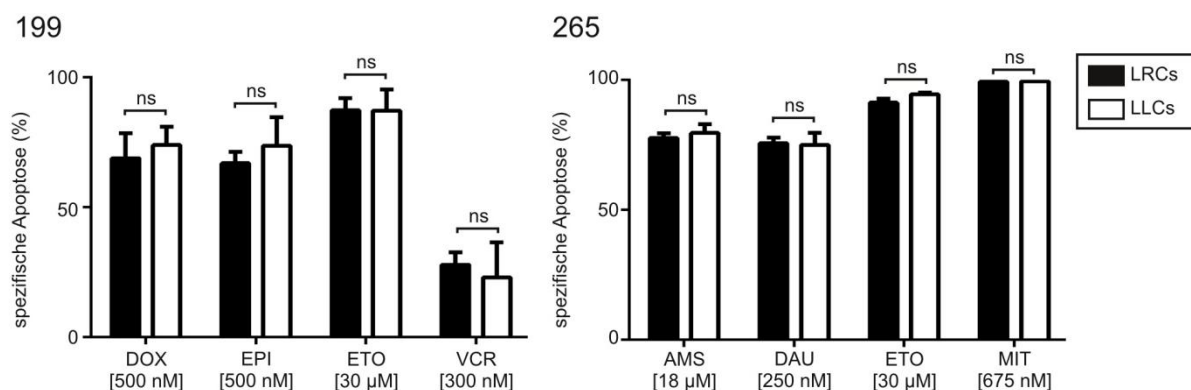


Abbildung 35: Kurzzeit-Apoptose-Assay LRCs und LLCs.

Kurzzeit-Apoptose-Assay zur Bestimmung der Apoptose-Sensitivität der LRCs im Vergleich zu LLCs. Zellen der Probe 199 wurden mit den Substanzen Doxorubicin (DOX), Epirubicin (EPI), Etoposid (ETO) und Vincristin (VCR) stimuliert. Zellen der Probe 265 wurden mit den Substanzen Amsacrin (AMS), Daunorubicin (DAU), Etoposid (ETO) und Mitoxantron (MIT) stimuliert. Signifikanz ist * $p < 0,05$ und wurde mittels Student-t-Verteilung ermittelt. ($n=3$)

Wie in Abbildung 35 zu sehen ist, war die *in vitro*-Sensitivität der LLC- und der LRC-Fraktion gegenüber allen verwendeten Substanzen nahezu identisch und unterschied sich nicht signifikant. Trotz der unterschiedlichen proliferativen Eigenschaften zum Zeitpunkt ihrer Isolierung zeigten die stimulierten Zellen keinen Unterschied in ihrer Apoptosesensitivität gegenüber konventionellen Chemotherapeutika nach einer Stimulierung über 48 Stunden *in vitro*.

5.5.2. Apoptose-Sensitivität unterschiedlich proliferierender Xenograftzellen *in vivo*

In 5.5.1 wurde gezeigt, dass zwischen LLCs und LRCs der Proben 199 und 265 kein Unterschied in der Apoptosesensitivität bei einer Stimulierung mit diversen Chemotherapeutika *in vitro* besteht. Allerdings konnte in 5.4.2 nachgewiesen

werden, dass das Umfeld der Xenograftzellen Einfluss auf ihr proliferatives Verhalten nimmt, wodurch es auch für eine unterschiedliche Apoptosesensitivität zwischen LLC- und LRCs verantwortlich sein könnte. Daher wurde untersucht, ob ein Unterschied in der Apoptosesensitivität der Zellen beider Fraktionen bei einer Stimulierung mit Chemotherapeutika *in vivo* existiert. Bei diesen Untersuchungen sollten die Zellen für die Dauer der Stimulierung in ihrem Umfeld im Knochenmark verbleiben.

Zur Analyse der Apoptosesensitivität der Xenograftzellen der LLC- und LRC-Fraktion der Proben 199 und 265 *in vivo* wurden je Probe vier Tiere mit 10 Millionen CFSE-markierten Zellen intravenös injiziert. Sieben Tage nach der Zellinjektion wurden die Tiere mittels *in vivo*-Bildgebung analysiert (Abbildung 36 und Abbildung 37; vor Therapie), um den Status der Leukämie durch Quantifizierung des Biolumineszenz-Signals zu bestimmen (Abbildung 38). Darauf wurden je Probe drei Tieren intraperitoneal Chemotherapeutika injiziert. Zwei Tiere, welche mit Zellen der Probe 199 injiziert worden waren, wurde die Substanz Vincristin (VCR) verabreicht, einem Tier die Substanz Doxorubicin (DOX). Zwei Tiere, welche mit Zellen der Probe 265 injiziert worden waren, wurde die Substanz Etoposid (ETO) injiziert, einem Tier die Substanz Mitoxantron (MIT). Dem verbleibenden, vierten Tier aus jeder der beiden Gruppen wurde zur Kontrolle das Vehikel der Substanzen (1 x PBS) injiziert. Die verabreichten Mengen der Substanzen können Tabelle 14 entnommen werden und orientierten sich an publizierten, in Mäusen tolerierten Mengen. Zehn Tage nach Zellinjektion, drei Tage nach Verabreichung der Zytostatika, wurden alle acht Tiere erneut durch *in vivo*-Bildgebung analysiert (Abbildung 36 und Abbildung 37; nach Therapie) und die Biolumineszenz-Signale quantifiziert (Abbildung 38).

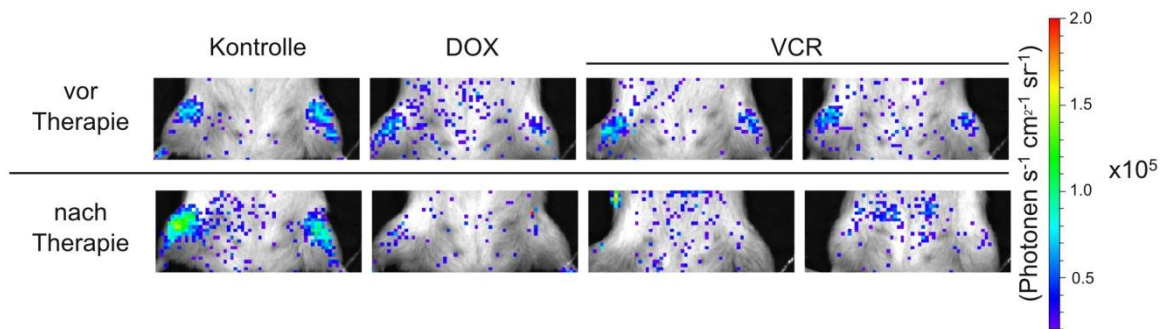


Abbildung 36: in vivo Therapie von 199.

In vivo-Bildgebungsdaten der unteren Extremitäten von Tieren, welche mit 10 Millionen Zellen der Probe 199 intravenös injiziert wurden. Sieben Tage nach Zellinjektion wurden die Tiere analysiert (vor Therapie). Anschließend wurde intraperitoneal 1 x PBS (Kontrolle), DOX oder VCR verabreicht. Drei Tage danach der Therapie wurden die Tiere erneut analysiert (nach Therapie). Einheiten der Farbskala sind Photonen pro Sekunde pro cm^2 pro Steradian ($Photonen s^{-1} cm^2 sr^{-1}$)

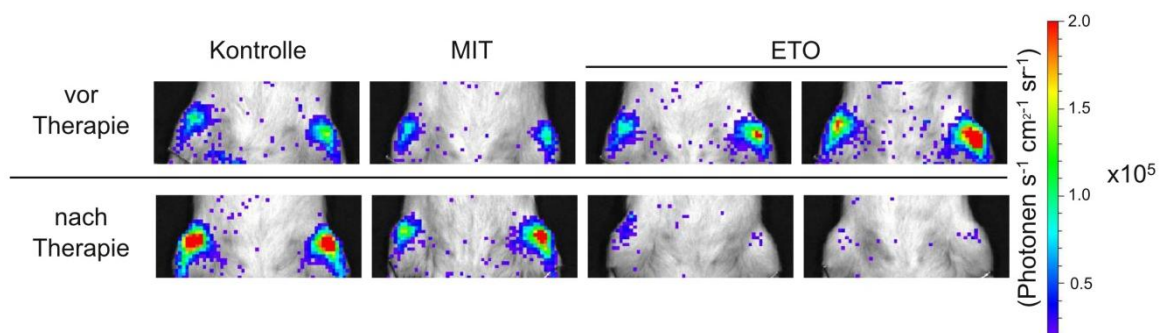


Abbildung 37: in vivo Therapie von 265.

In vivo-Bildgebungsdaten der unteren Extremitäten von Tieren, welche mit 10 Millionen Zellen der Probe 265 intravenös injiziert wurden. Sieben Tage nach Zellinjektion wurden die Tiere analysiert (vor Therapie). Anschließend wurde intraperitoneal 1 x PBS (Kontrolle), MIT oder ETO verabreicht. Drei Tage danach der Therapie wurden die Tiere erneut analysiert (nach Therapie). Einheiten der Farbskala sind Photonen pro Sekunde pro cm^2 pro Steradian ($Photonen s^{-1} cm^2 sr^{-1}$)

Sowohl in Abbildung 36 als auch in Abbildung 37 ist zu sehen, dass die für die Leukämie spezifischen Biolumineszenz-Signale in den unteren Extremitäten der Tiere durch eine Injektion mit den Chemotherapeutika reduziert wurden, wo hingegen die Injektion des Vehikels keine Reduktion bewirkte, sondern die Signale in den Beinen der Tiere an Intensität zunahmten und größer wurden. Die Signalstärke dieses Hintergrundes ist in Abbildung 38 durch eine gestrichelte Linie dargestellt. Es kann eine Reduktion in der Quantifizierung des Biolumineszenz-Signals in den therapierten Tieren beider Proben festgestellt

werden, wohingegen das Signal in den Kontrolltieren weiter stieg. Die einzige Ausnahme ist das Tier, welches mit Zellen der Probe 265 injiziert und mit Mitoxantron (MIT) behandelt wurde. Allerdings konnte bei diesem Tier festgestellt werden, dass das Biolumineszenz-Signal nicht so schnell zunahm wie bei dem Kontrolltier. In allen anderen Tieren ist es möglich, dass die Therapie eine Reduktion der Leukämie last zur Folge hatte und nicht nur eine Wachstumsinhibierung.

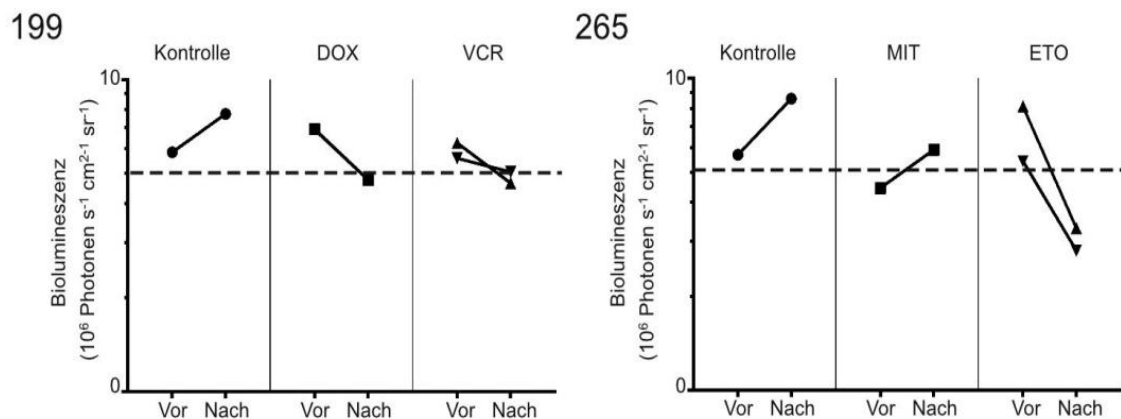


Abbildung 38: Quantifizierung der in vivo Therapie.

Quantifizierung der in vivo-Bildgebungssignale von Tieren, welche mit Zellen der Proben 199 und 265 injiziert und anschließend therapiert wurden. Die Tiere wurden vor und nach der Therapie analysiert. Jedes Symbolpaar repräsentiert diese beiden Daten für ein Tier.

Zehn Tage nach der Zellinjektion, drei Tage nach Verabreichung der Chemotherapeutika, wurden die Xenograftzellen aus dem Knochenmark der Tiere isoliert (5.2) und ihre Anzahl mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abbildung 39).

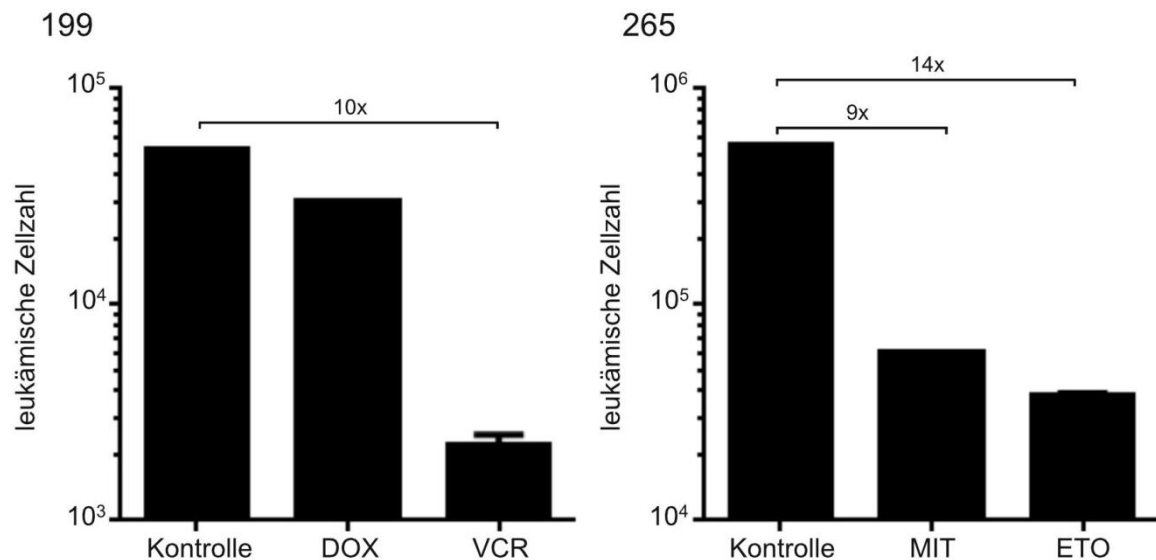


Abbildung 39: Xenograftzellen im Knochenmark nach Therapie.

Nach der Behandlung von Tieren mit Chemotherapeutika, welche mit Zellen der Proben 199 und 265 injiziert wurden, wurden die Xenograftzellen aus dem Knochenmark der Tiere isoliert und ihre Zellzahl bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. ($n=2$)

In Abbildung 39 ist zu sehen, dass aus dem Knochenmark der Kontrolltiere mehr Xenograftzellen isoliert werden konnten, als aus dem Knochenmark von Tieren, denen die Wirkstoffe verabreicht worden waren. Bei einer Behandlung der Probe 199 mit Vincristin sind zehnfach weniger Xenograftzellen vorhanden als in dem Kontrolltier (Abbildung 39). Ebenso wurde die Anzahl der Xenograftzellen der Probe 265 mit Etoposid (Abbildung 39, Reduktion der Zellzahl um Faktor 14) und Mitoxantron (Abbildung 39, Reduktion der Zellzahl um Faktor 9) reduziert. Bei einer Behandlung der Probe 199 mit Doxorubicin wurde die Anzahl der Xenograftzellen um lediglich Faktor 2 reduziert.

Anhand der in 5.4.1 beschriebenen Auswertung war es möglich, eine LRC-Fraktion der isolierten Zellen zu definieren. Dabei wurde der LRC-Bereich so gewählt, dass er den gleichen prozentualen Anteil umfasste, wie in den Kinetiken der jeweiligen Probe in 5.4.1. Bestimmt man den prozentualen Anteil der LRCs der Gesamtpopulation (Gate in Abbildung 40) und vergleicht diesen Anteil zwischen Zellen, welche im Knochenmark Zytostatika ausgesetzt waren, mit Zellen aus Tieren, welche mit dem Vehikel behandelt wurden, ist zu sehen, dass der Anteil der LRCs durch eine Behandlung mit Zytostatika zunimmt (Abbildung 41).

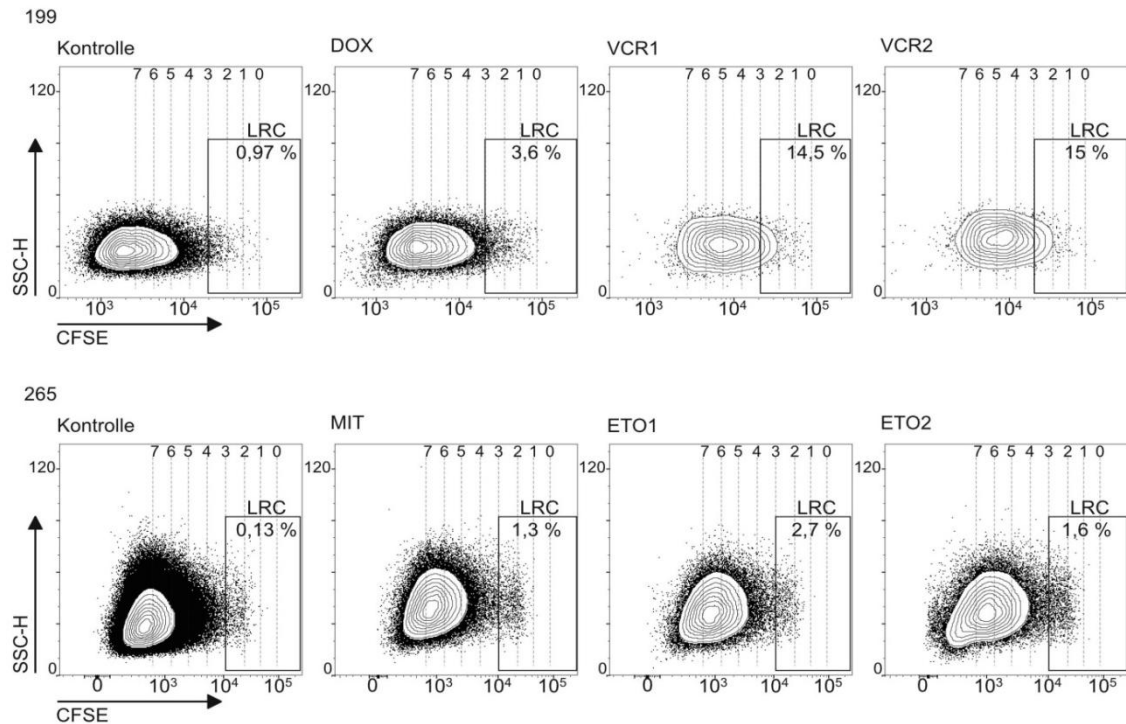


Abbildung 40: CFSE-Verteilung nach Therapie.

Analyse des CFSE-Signals von Xenograftzellen der Proben 199 und 265, welche aus dem Knochenmark von zuvor mit Zytostatika behandelten NSG-Mäusen isoliert wurden.

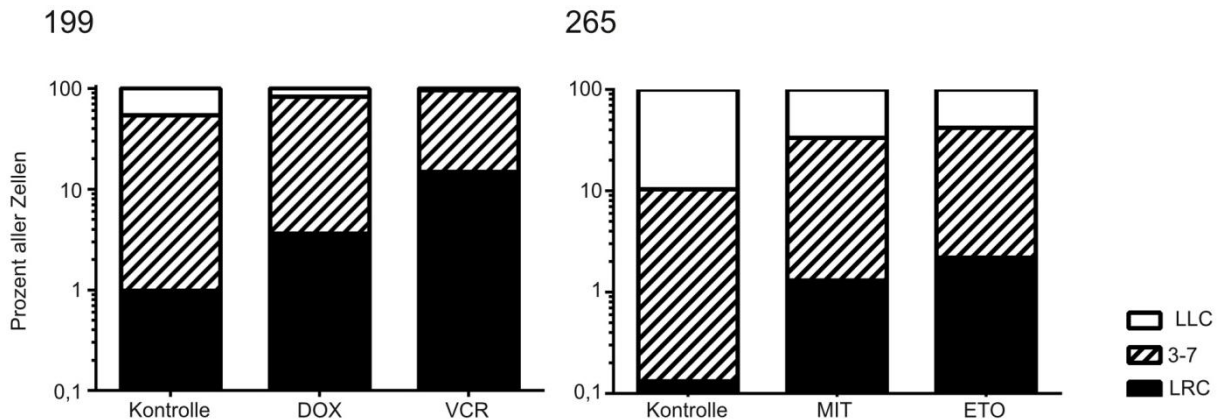


Abbildung 41: Anteil LRCs nach Therapie.

Prozentualer Anteil von LRCs an allen im Knochenmark vorhandenen Xenograftzellen. NSG-Mäuse wurden mit Zellen der Proben 199 und 265 injiziert und nach sieben Tagen mit Zytostatika behandelt. Zehn Tage nach Injektion wurden die Xenograftzellen aus dem Knochenmark isoliert und im Durchflusszytometer analysiert.

Die Behandlung mit Zytostatika hat den Anteil der nicht-LRCs stärker reduziert als den Anteil der LRCs. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass LRCs *in vivo* weniger sensitiv gegenüber Chemotherapie sind als LLCs. Vergleicht man die absoluten Zellzahlen der LRC-Fraktion mit der Zahl aller aus dem Knochenmark

isolierten Xenograftzellen, ist festzustellen, dass eine Behandlung der Tiere mit den Wirkstoffen die Anzahl aller Xenograftzellen im Knochenmark der NSG-Mäuse reduziert, die Anzahl der LRCs wird jedoch nicht beeinflusst (Abbildung 42).

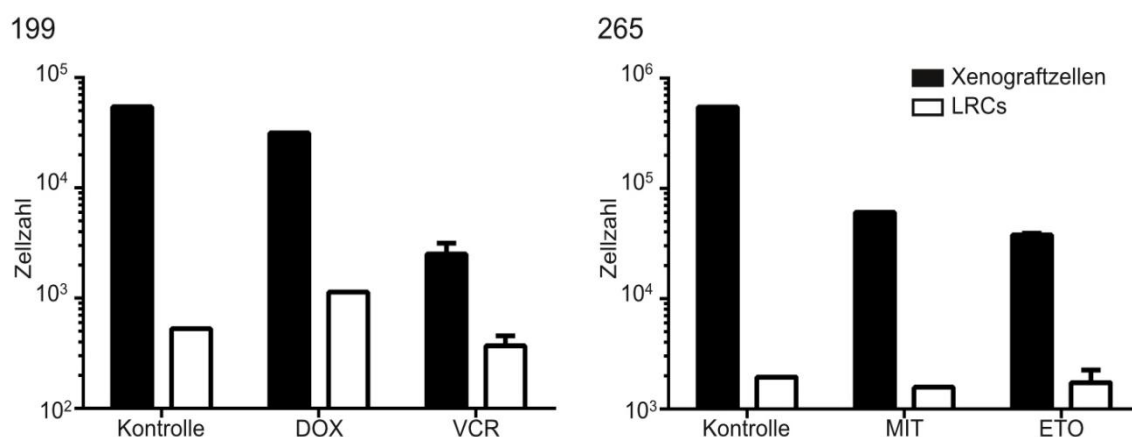


Abbildung 42: Reduktion der LRC-Zellzahl und Gesamtzellzahl durch *in vivo*-Therapie.

Vergleich der absoluten Anzahl von LRCs mit der Anzahl aller im Knochenmark von NSG-Mäusen vorhandenen Xenograftzellen nach deren Injektion mit den Proben 199 oder 265 und der anschließenden Behandlung mit Zytostatika. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. (n=2)

Dem zur Folge sind LRCs resistent gegenüber einer *in vivo*-Therapie mit konventionellen Chemotherapeutika.

So konnte gezeigt werden, dass keine signifikanten Unterschiede der Apoptosesensitivität von LRCs und LLCs der gleichen Xenograftprobe nachgewiesen werden konnten, nachdem diese isoliert und *in vitro* mit Zytostatika stimuliert wurden. Wurden jedoch NSG-Mäuse sieben Tage nach Injektion mit CFSE-markierten Xenograftzellen mit Zytostatika behandelt, hatte dies eine Anreicherung der LRCs zur Folge. Während die Anzahl der LRCs durch die Behandlung nicht beeinflusst wurde, wurde die Leukämieast der NSG-Mäuse reduziert. Dem zur Folge scheinen die LRCs *in vivo* chemoresistent zu sein, was bei einer Behandlung *in vitro*, außerhalb ihrer Umgebung im Knochenmark, nicht der Fall ist.

5.6. Vergleichende Genexpressionsanalysen

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die im Laufe dieser Arbeit identifizierten LRCs der beiden Xenograftproben 199 und 265 eine Resistenz gegenüber einer *in vivo*-Behandlung mit Chemotherapeutika aufwiesen. Therapieresistente Subfraktionen von Krebszellen stellen ein großes Risiko für Patienten dar, da sie ein erneutes Auswachsen der Krankheit nach Abschluss der Therapie einleiten können. Um Gründe für die unterschiedliche Chemosensitivität zu ermitteln, wurden die Genexpressionsprofile der identifizierten LRCs daher mit denen von LLCs der gleichen Probe verglichen.

Um die Genexpression der LRCs mit der der LLCs zu vergleichen, wurden von der Probe 265 21 Tage nach ihrer Injektion je zwei mal 40 Zellen der LRC-Fraktion und zwei mal 40 Zellen der LLC-Fraktion aus zwei Tieren isoliert. Die isolierten Zellen wurden an das Fraunhofer ITEM-R in Regensburg geschickt und dort von der Projektgruppe "Personalisierte Tumorthherapie" bearbeitet. Dabei wurde das gesamte Transkriptom der Zellen in den insgesamt acht zur Verfügung stehenden Proben amplifiziert. Sechs der acht Amplifikate eigneten sich für anschließende Microarray Hybridisierungen, welche ebenfalls von der Projektgruppe "Personalisierte Tumorthherapie" durchgeführt wurden. Anschließend wurden die Expressionsprofile der Proben beider Zellfraktionen ausgewertet. Die 50 Gene, welche in den beiden Fraktionen am unterschiedlichsten exprimiert wurden, sind in Tabelle 15 aufgeführt. In Tabelle 15 ist zu sehen, dass die LRCs im Vergleich zu den LLCs vorwiegend Gene runter regulierten.

Tabelle 15: Top 50 Gene

Hochreguliert in LRCs
<i>c6orf89</i>
Runter reguliert in LRCs
<i>fabp5, skp1, rps5, csrp2, idh2, myh9, c14orf156, sugt1, nol7, stag3l2, nedd8, pom121, uqcr10, mapksp1, ldha, spdye7p, eef1d, lsm14b, ndufb1, gna15, cbx5, rps9, ckap5, fbl, rps5, atxn3, brd7p3, snmp70, ddt, tbca, pbx2, eid1, xbp1, apobec3f, hnrnpa3, znf419</i>

Das einzige in den LRCs hochregulierte Gen, *c6orf89*, codiert für drei unterschiedliche Proteine (Laloti, Vergarajauregui et al. 2013). Die runter regulierten Gene codieren unter anderem für Proteine, welche an der Proteinproduktion (*rps9*, *rps5*, *eef1d*, *snrnp70*, *pbx2* (Transkriptionsaktivator), *xbp1* (Transkriptionsaktivator), *znf419* (Transkriptionsregulierung)) der Zellentwicklung und Differenzierung (*csrp2*), der Zellteilung (*sugt1*, *apobec3f* (Wachstum und Zellzykluskontrolle)) und der Energieproduktion (*idh2*, *uqcr10*) beteiligt sind (Kitagawa, Skowrya et al. 1999, Shen, Rozenfeld et al. 1999, Weiskirchen und Gressner 2000, Adams, van der Weyden et al. 2001, Uechi, Tanaka et al. 2001, Hu, Dougan et al. 2009).

Es wurde untersucht, ob Oberflächenproteine, welche als Marker für hämatopoetische Stammzelldifferenzierung, Therapieresistenz, tumorinduzierende Zellen, Zellzyklus, interzelluläre Adhäsion oder Krebs-Stammzellmarker bekannt sind, in den beiden Fraktionen unterschiedlich stark exprimiert werden. Dazu wurde die Expression der in Tabelle 16 aufgelisteten Gene, welche für unterschiedliche Marker codieren, in den beiden analysierten Fraktionen verglichen. Eine signifikant unterschiedliche Expression eines Genes in den beiden Fraktionen besteht dann, wenn der p-Wert unter 0,05 liegt. In Tabelle 16 ist zu sehen, dass die Gene, welche für die Proteine Tie2, VCAM-1 und LFA-1 codieren, in den LRCs signifikant stärker exprimiert werden als in den LLCs. Alle drei Proteine sind wichtig für die interzelluläre Adhäsion. Die Proteine Tie2 und VCAM-1 werden des Weiteren mit einer Therapieresistenz von Krebszellen in Verbindung gebracht. Die Expression aller anderen untersuchten Gene unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den beiden Fraktionen.

Tabelle 16: Genexpression von Oberflächenmarker

Protein	Marker für	Gensymbol	mean-Wert in LRC	mean-Wert in LLC	p-Wert
CD33	1	CD33	1,455	1,281	0,698
CD34	1	CD34	2,182	1,897	0,600
CD38	1	CD38	0,690	0,472	0,293
CD44	2, 5	CD44	3,184	2,991	0,543
CD45	1	PTPRC	0,874	1,475	0,406
CD71	1	TFRC	0,901	0,668	0,356
CD90	1	THY1	2,695	2,921	0,412
CD115	1	CSF1R	0,944	1,719	0,316
CD116	1	CSF2RA	0,795	1,374	0,277
CD117	1	KIT	1,622	1,044	0,127
CD133	3	PROM1	1,974	1,135	0,112
CD147	2, 4	BSG	1,829	2,779	0,503
CD163	1	CD163	0,900	0,899	0,995
ALDH1	2, 6	ALDH1A1	0,729	0,813	0,610
EpCAM	6	EPCAM	0,696	0,973	0,205
HLA-DR	1	CD74	4,173	4,112	0,725
ICAM1	2, 5	ICAM1	1,049	0,745	0,508
N-Cadherin	2, 5	CDH2	3,244	3,352	0,796
Tie2	2, 5	TEK	2,145	1,027	0,034
VCAM-1	2, 5	VCAM1	1,582	1,062	0,050
LFA-1	5	ITGAL	3,127	1,298	0,003

1: hämatopoetische Stammzelldifferenzierung; 2: Therapieresistenz; 3: tumorinduzierende Zellen;
4: Zellzyklus; 5: interzelluläre Adhäsion; 6: Krebs-Stammzellmarker

Zusammengefasst wurde durch vergleichende Genexpressionsanalysen der LRC und LLCs gezeigt, dass LRCs vorwiegend Gene weniger stark exprimieren als LLCs. Die runter regulierten Gene codieren für Proteine, welche an der Proteinproduktion, der Zellentwicklung und Differenzierung, der Zellteilung und der Energieproduktion beteiligt sind. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Oberflächenproteine Tie2, VCAM-1 und LFA-1 in LRCs signifikant stärker exprimiert wurden, als in LLCs.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Subpopulation in patientenabgeleiteten ALL-Zellen existiert, die sich nicht teilt und sich komplett resistent gegenüber systemischer Tumorthherapie verhält. Gentechnologische Techniken verknüpft mit Tierarbeiten, dem Einsatz von primären Tumorzellen von Patienten mit ALL sowie hocheffizienten Aufreinigungsstrategien ermöglichten, diese Zellen zu isolieren und damit Untersuchungen zuzuführen. Erste Charakterisierungsschritte wiesen auf eine wichtige Rolle der Knochenmarknische für das Verhalten der ALL-Zellen hin. Die hier identifizierten Zellen erlaubten erstmals Untersuchungen zur Biologie und Therapiemechanismen an ruhenden und in vivo resistenten ALL-Zellen. Künftige Studien an diesen Zellen sollen ermöglichen, neue Therapieoptionen für ruhende, therapieresistente Zellen im Patienten zu entwickeln, um dadurch letztendlich die Prognose von Patienten mit ALL zu verbessern.

6. Diskussion

Ziel der Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation war es, eine sich selten oder gar nicht teilende Subfraktion von ALL-Xenograftzellen zu identifizieren und zu beschreiben. Dazu wurden drei transgene ALL-Xenograftproben mittels lentiviraler Transduktion generiert, mit denen die Etablierung einer neuen Methode zur Isolierung geringer Mengen von Xenograftzellen aus murinem Knochenmark möglich war. Diese Methode wurde im Laufe der Arbeit validiert.

Durch die Etablierung der neuen Isolationsmethode wurde das *in vivo*-Wachstum der drei transgenen Proben untersucht werden. Bei diesen Untersuchungen wurde ein heterogenes Proliferationsverhalten der verwendeten Xenograftzellen entdeckt und dieses anschließend genauer analysiert. Durch diese Analysen wurden Fraktionen von sich häufig und sich selten teilenden Zellen definiert und miteinander bezüglich ihrer Umwandlungsfähigkeit zu Zellen der jeweils anderen Fraktion, ihrer Frequenz von leukämieinduzierenden Zellen und ihrer Apoptosesensitivität gegenüber konventionellen Zytostatika *in vitro* und *in vivo* verglichen. Des Weiteren wurden vergleichende Transkriptomanalysen von Zellen aus beiden Fraktionen durchgeführt.

Im Laufe der Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit konnte das unterschiedliche Wachstumsverhalten von drei ALL-Xenograftproben charakterisiert und eine Fraktion langsam proliferierender Zellen mit schnell proliferierenden Zellen verglichen werden.

6.1. Etablierung der neuen Isolationsmethode

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Detektion von geringen Mengen von ALL-Xenograftzellen im Knochenmark von NSG-Mäusen etabliert. Die Methode ist dazu in der Lage, die Anzahl der im Knochenmark vorhanden Xenograftzellen möglichst genau zu bestimmen. Des Weiteren werden die detektierten Zellen in einem vitalen Zustand isoliert, wodurch anschließend funktionelle Untersuchungen mit ihnen durchgeführt werden können. Die neue Methode besteht aus zwei Schritten: einem Magnet-basierenden (MACS), sowie einem auf Durchflusszytometrie basierenden (FACS) Anreicherungsschritt.

Für die Isolation der Xenograftzellen wurden nur transgene Marker verwendet, da endogene Marker möglicherweise nicht auf allen Subfraktionen der Leukämiezellen exprimiert werden könnten. Dies würde bei einer Isolation über endogene Marker dazu führen, dass die entsprechenden Subfraktionen bei einer Isolation verloren gingen. Außerdem werden endogene Marker auf unterschiedlichen Proben unterschiedlich stark exprimiert, was die Etablierung eines individuellen Protokolls für jede Probe erfordern würde. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Markierung mit Antikörpern gegen endogene Oberflächenproteine die Funktion von Zellen beeinträchtigen kann (Taussig, Miraki-Moud et al. 2008), was sich nachteilig auf sich an die Isolation anschließende, funktionelle Untersuchungen auswirken könnte. Daher wurden lediglich transgene Marker verwendet, um die gesamte Vielfalt der Xenograftzellen in einen möglichst funktionellen Zustand zu isolieren.

Um transgene ALL-Xenograftproben herzustellen, wurde ein lentivirales Transduktionssystem der dritten Generation verwendet, welches dazu in der Lage ist, auch ruhende, sich nicht teilende Zellen zu infizieren (Naldini, Blömer et al. 1996, Dull, Zufferey et al. 1998, Zufferey, Donello et al. 1999). Diese Eigenschaft des verwendeten Transduktionssystems ist besonders wichtig, da sich die ALL-Xenograftzellen *in vitro* nicht teilen (Terziyska, Alves et al. 2012). Das verwendete System birgt allerdings den Nachteil, dass die Integration der Transgene in das Genom die Eigenschaften der Xenograftzellen verändern kann. Unter Verwendung des in dieser Arbeit angewendeten, nicht-viralen EF1 α -Promoters konnten solche Veränderungen in ALL-Xenograftzellen jedoch bisher nicht festgestellt werden (Terziyska, Alves et al. 2012).

Nach der Transduktion der Xenograftzellen wurden diese in NSG-Mäuse injiziert, um sie später wieder aus der Milz zu isolieren und die transgenen von den nicht-transgenen Zellen mittels Durchflusszytometrie zu trennen. Um zu vermeiden, dass bei der Sortierung Subklone selektiert werden, welche für die Ausgangsprobe nicht repräsentativ sind, wurde als Voraussetzung definiert, dass nach der ersten Transduktion mindestens 5 % der ALL-Xenograftzellen die Transgene exprimieren. Des Weiteren sollten möglichst viele Zellen nach einem ersten Transduktionsschritt transgen sein, um diese in einem einzigen Sortierschritt von nicht-transgenen Zellen zu trennen. Dieses Vorgehen diente

dazu, unnötige Passagen in der Maus zu vermeiden. Nicht alle in dieser Arbeit verwendeten Xenograftproben konnten mit dem neu generierten Virus 2 in einem Schritt zu über 5 % transduziert werden. Deshalb wurde die Probe 233 unter Verwendung einer Kombination aus Virus 3 und Virus 5 transduziert, da diese beiden Viren einen wesentlich höheren Titer aufwiesen als Virus 2, wodurch bei gleicher Anwendung mehr infizierende Partikel zur Verfügung standen (Tabelle 9). Der Unterschied der Virentiter lässt sich durch den größeren Transfervektor des Virus 2 im Vergleich zu den anderen beiden Viren erklären, da gezeigt werden konnte, dass die Effektivität der Virenproduktion in einem negativen Zusammenhang mit der Größe des Transfervektors steht (Kumar, Keller et al. 2001).

Nachdem die transgenen Xenograftproben generiert wurden, wurde ein Versuch zur Validierung der neuen auf MACS und FACS-basierenden Detektionsmethode durchgeführt, bei dem eine bestimmte Anzahl von Xenograftzellen unter das Knochenmark von NSG-Mäusen gemischt wurde. Bei der durchflusszytometrischen Analyse nach der MACS-Separation, einer reinen Knochenmarkssuspension ohne Xenograftzellen, wurden 88 Ereignisse detektiert, welche sowohl ein DAPI- als auch ein mCD45-negatives, aber mKate- und NGFR-positives Signal aufwiesen (Abbildung 16; Tabelle 1). Bei diesen Ereignissen könnte es sich um murine Zellen nicht hämatopoetischen Ursprungs handeln, welche eine hohe Autofluoreszenz in den Kanälen für mKate und PerCP-Cy5.5 aufweisen. Sie können mit der hier verwendeten Färbung nicht von Xenograftzellen unterschieden werden und müssen als Hintergrund von allen gemessenen Werten abgezogen werden. Daher kann mit der hier vorgestellten Methode keine Aussage über ein Vorhandensein von weniger als 0,0001 % Xenograftzellen im Knochenmark getroffen werden. Um künftig auch diese Hintergrund-Ereignisse von der Analyse auszuschließen, könnte ein weiterer Marker, zum Beispiel ein weiterer muriner Oberflächenmarker, der Färbung hinzugefügt werden. Eine weitere Möglichkeit, das Hintergrundproblem zu beheben, wäre es, transgene Xenograftzellen zu generieren, welche die Transgene stärker exprimieren, wodurch sie sich deutlicher vom Hintergrund unterscheiden würden. Die verwendete Methode erlaubt allerdings eine ausreichend genaue Aussage über die Anzahl der Xenograftzellen im Knochenmark von NSG-Mäusen, um die in dieser Arbeit gestellten Fragen zu

beantworten, weshalb die vorgestellte Detektionsmethode verwendet wurde. Da bei der Isolierung der detektierten Xenograftzellen nur geringe Verluste zu verzeichnen sind, war die hier beschriebene Methode ebenfalls ausreichend, um Xenograftzellen für funktionelle Untersuchungen aus dem Knochenmark von NSG-Mäusen zu isolieren.

6.2. Beschreibung des Wachstums von ALL-Xenograftzellen *in vivo*

Über das Wachstum der akuten lymphatischen Leukämie im Patienten ist nahezu nichts bekannt, da sich der Patient zum Zeitpunkt der Diagnose meistens bereits in einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit befindet und sofort therapiert werden muss. Über die Wachstumsentwicklung der Leukämie vor ihrer Diagnose ist in der Regel ebenfalls nichts bekannt. Kenntnisse über das Wachstum der ALL würden allerdings das Verständnis der Erkrankung vertiefen und könnten dabei helfen, Therapien zu verbessern oder neue Therapieansätze zu entwickeln. Auf Grund des orthotrophen Wachstums der ALL-Zellen in dem hier verwendeten Xenograft-Modell wird die Situation im Patienten bestmöglich wiedergespiegelt (Liem, Papa et al. 2004, Lee, Bachmann et al. 2007), weshalb es in dieser Arbeit zur Untersuchung des Wachstumserhaltens von Zellen der ALL verwendet wurde.

Die ersten Untersuchungen zum Wachstum der ALL-Xenograftzellen wurden zur Bestimmung der Anzahl der im Knochenmark anwachsenden Xenograftzellen durchgeführt. Bei einer Injektion von 10 Millionen ALL-Xenograftzellen in die Schwanzvene der Tiere konnte nach drei Tagen nur eine geringe Menge der injizierten Zellen im Knochenmark, dem Ursprung des Leukämiewachstums im Patienten sowie in NSG-Mäusen, nachgewiesen werden. Da das Knochenmark eines der am besten mit Blut durchströmten Organe ist und bei Untersuchungen zur normalen Hämatopoese das Einfinden von intravenös injizierten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark bereits nach vier Stunden abgeschlossen ist (Ellis, Grassinger et al. 2011), ist es unwahrscheinlich, dass die Zellen noch im Blutstrom fluktuieren und noch zu einem späteren Zeitpunkt in das Knochenmark finden werden. Vermutlich sind die nicht auffindbaren Zellen nach drei Tagen bereits abgestorben.

Eine mögliche Ursache für den geringen Anteil der im Knochenmark wiedergefundenen Zellen könnte sein, dass eine verbleibende Restimmunität der Mäuse die Effizienz des Anwachsens der humanen Zellen mindert. Da die hier verwendeten NSG-Mäuse jedoch weder B-,T- noch ausgereifte NK-Zellen produzieren, scheint diese Möglichkeit sehr unwahrscheinlich (Shultz, Ishikawa et al. 2007). Des Weiteren könnte auch der Zusammenstoß der humanen Zellen mit dem murinen Umfeld deren Zytokinproduktion beeinflussen, wodurch ihre Fähigkeit zum Anwachsen gemindert wird (Meyer und Debatin 2011). Zwar wird vermutet, dass autokrine Zytokinstimulation für das Wachstum von ALL wichtig ist (Meydan, Grunberger et al. 1996), allerdings wurde noch keine Kombination aus Zytokinen entdeckt, welche das Überleben von ALL-Zellen *in vitro* begünstigt, weshalb auch diese Ursache unwahrscheinlich ist.

Ein weiterer Grund für die geringe Anwachseffizienz der injizierten Zellen könnte darin zu finden sein, dass die Zellen nach ihrer Injektion ein bestimmtes Umfeld benötigen, um anzuwachsen. Über hämatopoetische Stammzellen ist bekannt, dass sie bevorzugt in Nischen mit nicht-hämatopoetischen Stromazellen auftreten (Köhler, Schmithorst et al. 2009) und sich nach ihrer Transplantation innerhalb eines syngenesischen Mausmodells in kürzester Zeit bevorzugt in diesen Nischen ansiedeln (Ellis, Grassinger et al. 2011). Das Auftreten von AML-Xenograftzellen in Nischen im Bereich der inneren Knochenhaut von NSG-Mäusen ist ebenfalls beschrieben (Ishikawa, Yoshida et al. 2007, Saito, Uchida et al. 2010). Werden Nischen im Knochenmark für das Anwachsen von ALL-Xenograftzellen ebenfalls benötigt und ist die Anzahl dieser Nischen limitiert, könnten nur so viele injizierte Zellen im Knochenmark anwachsen, wie Nischen zur Verfügung stehen. Zellen, welche keine Nischen finden, könnten weiterhin im Blutstrom fluktuieren und letztlich abgebaut werden. Diese Annahme könnte erklären, weshalb nur ein geringer Anteil der in dieser Arbeit injizierten Xenograftzellen kurze Zeit nach ihrer Injektion im Knochenmark nachgewiesen werden konnte.

In Patienten sowie in xenotransplantierten NSG-Mäusen ist ein Anteil von ALL-Zellen im Knochenmark von über 70 % keine Seltenheit (Terziyska, Alves et al. 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass die ALL-Xenograftzellen zu einem Zeitpunkt beginnen, im Knochenmark langsamer zu wachsen oder in

andere Kompartimente auszuwandern, bei dem ihr Anteil im Knochenmark erst 1 % ausmacht. Die exponentielle Zunahme der ALL-Xenograftzellen im Knochenmark wird also zu einem Zeitpunkt beendet, an dem die maximale Kapazität des Knochenmarks für Xenograftzellen noch nicht erreicht ist. Wie durch das Überlagern mit Wachstumsmodellen gezeigt werden konnte, verfolgen die Xenograftzellen im Knochenmark der NSG-Mäuse daher ein logistisches Wachstumsverhalten. Logistische Wachstumsmodelle werden zur Beschreibung des Wachstums von soliden Tumoren verwendet (Vaidya und Alexandro Jr 1982, Araujo und McElwain 2004). Außerdem bestehen Hinweise darauf, dass disseminierende Tumore ein Wachstum nach dem Gompertz` Modell aufweisen, welches, ebenso wie das logistische Modell, ein begrenztes Wachstum beschreibt (Afenya und Calderón 2000). Gründe für die Abnahme des Wachstums der Xenograftzellen im Knochenmark könnten ein auftretender Mangel an Nährstoffen oder Sauerstoff sein, wie es für das Wachstum solider Tumoren beschrieben wurde (Casciari, Sotirchos et al. 1992, Brú, Albertos et al. 2003). Außerdem kann ein Auswandern von Xenograftzellen in andere Organe, wie der Milz, der Leber oder der Lunge, die Zunahme der Zellen im Knochenmark reduzieren.

6.3. Proliferationsverhalten und LRCs

Um das proliferative Verhalten der ALL-Xenograftzellen zu beschreiben, wurde der proliferative Marker CFSE verwendet. CFSE wurde bereits erfolgreich als proliferativer Marker in Lymphozyten (Lyons und Parish 1994, Parish 1999), murinen hämatopoetischen Stammzellen (Takizawa, Regoes et al. 2011) sowie Xenograftzellen von soliden Tumoren (Moore, Houghton et al. 2012) verwendet. Daher war es naheliegend, dass CFSE auch als proliferativer Marker in den hier verwendeten ALL-Xenograftzellen verwendet werden kann, wie es durch eine Doppeltmarkierung mit BrdU in dieser Arbeit bestätigt wurde. Ebenso konnte gezeigt werden, dass der Verlust des CFSE-Signals in einem direkten Zusammenhang mit einer Zunahme der Xenograftzellzahl im Knochenmark steht. CFSE konnte also als verlässlicher, proliferativer Marker für die hier untersuchten ALL-Xenograftzellen verwendet werden. Nach der Injektion von CFSE-markierten ALL-Xenograftzellen aller drei in dieser Arbeit verwendeten Proben in NSG-

Mäuse wurden diese zu unterschiedlichen Zeitpunkten wieder aus dem Knochenmark isoliert und ihr CFSE-Signal untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die meisten Xenograftzellen ihr CFSE-Signal im Laufe der Zeit verlieren. Zellen, welche ihr gesamtes CFSE-Signal verloren haben, hatten dabei mehr als siebenmal ihr CFSE-Signal halbiert. Es konnten jedoch zu jedem Isolationszeitpunkt, selbst nach 21 Tagen, Zellen gemessen werden, welche ihr CFSE-Signal noch nicht gänzlich verloren hatten. Diese Zellen haben dem zur Folge seit ihrer Injektionen weniger Zellteilungen durchlaufen als jene Zellen, welche ihr gesamtes Signal verloren hatten. Somit wurde hier ein heterogenes Proliferationsverhalten der ALL-Xenograftzellen im Knochenmark von NSG-Mäusen festgestellt, welches im weiteren Verlauf dieser Arbeit charakterisiert wurde.

Durch einen Versuch, bei dem Zellen aus dem Knochenmark von NSG-Mäusen isoliert wurden, welche ihr CFSE-Signal bereits nach 14 Tagen verloren hatten und diese erneut mit CFSE gefärbt wurden, wurde festgestellt, dass eine erneute Injektion dieser Zellen wiederum ein heterogenes Wachstum zur Folge hat. Dadurch wurde nachgewiesen, dass ALL-Xenograftzellen, welche sich schnell teilen, nach einer erneuten Transplantation unter anderem Zellen hervorbringen, welche sich sehr langsam teilen. Daher scheint das proliferative Verhalten nicht im Genom jeder Zelle festgelegt, sondern variabel zu sein. Hierbei könnten Signale des Umfeldes der Xenograftzellen eine entscheidende Rolle spielen, wie es bei hämatopoetischen Stammzellen der Fall ist, bei denen die umgebenden Nischenzellen durch Signalübertragung direkt Anteil an dem proliferativen Verhalten der Stammzelle nehmen (Spradling, Drummond-Barbosa et al. 2001, Arai, Hirao et al. 2004, Arai und Suda 2007).

Bei genauerer Analyse der CFSE-Verteilung der isolierten Zellen wurde festgestellt, dass selbst 21 Tage nach ihrer Injektion immer noch Zellen detektiert werden konnten, welche im Vergleich zur CFSE-Intensität von Zellen, die bereits nach drei Tagen isoliert wurden, maximal dreimal ihr CFSE-Signal halbiert hatten. Diese, auf Grund ihres Beibehaltens des CFSE-Signals LRCs (Markierung behaltende Zellen, englisch: „label retaining cells“) genannten Zellen, traten bei allen drei untersuchten transgenen Xenograftproben auf. LRCs weisen also in ihrem Wachstum ein Phase des sich langsamen Teilens oder

Ruhens auf, welche zumindest bei Probe 199 und 265 für die Hälfte der Lebensdauer einer Maus, welche mit einer dieser beiden Proben injiziert wurde, andauert. Länger andauernde proliferative Ruhe ist eine Eigenschaft von Stammzellen und wurde unter anderem bei hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen (Arai, Hirao et al. 2004, Takizawa, Regoes et al. 2011).

Die Ruhe dieser Zellen kann von der Stammzellnische im Knochenmark induziert werden (Spradling, Drummond-Barbosa et al. 2001, Arai und Suda 2007) und ist wichtig für die langandauernde Erhaltung von Stammzellen (Reya, Morrison et al. 2001). Dem zur Folge handelt es sich bei den hier identifizierten LRCs um Xenograftzellen, welche ein stammzelleigenes Charakteristikum aufweisen, wie es ebenfalls für tumorinduzierende Zellen angenommen wird (Gires 2011). Da eine weitere Eigenschaft von tumorinduzierenden Zellen die Fähigkeit zum Anwachsen nach Xenotransplantation ist, wurde in weiteren Experimenten untersucht, ob die Frequenz der leukämieinduzierenden Zellen in der Fraktion der LRCs höher ist als in der Fraktion der LLCs (Markierung verlierende Zellen, englisch: „label losing cells“).

Zur Bestimmung der LIC-Frequenz in den beiden Fraktionen beider Proben wurden „limiting dilution transplantation assays“ (LDTAs) durchgeführt, welche als Standard gelten, um LIC-Frequenzen zu bestimmen (Kong, Yoshida et al. 2008, Alves, Terziyska et al. 2012). Dazu wurden LRCs der drei in dieser Arbeit verwendeten Proben isoliert und parallel zu LLCs der gleichen Probe aus der gleichen Maus in unterschiedlichen Verdünnungen in NSG-Mäuse transplantiert. Da keines der Tiere, welches mit Xenograftzellen der Probe 233 injiziert worden war, eine Leukämie entwickelte, kann über die Frequenz der leukämieinduzierenden Zellen dieser Probe lediglich geschlussfolgert werden, dass sie über eine Zelle in 1.000 sein muss. Bei Verfolgung des Anwachsens der Xenograftzellen der Proben 199 und 265 in den Mäusen durch *in vivo* Bildgebung wurde festgestellt, dass beide Zellfraktionen bei einer Transplantation der gleichen Zellzahl ein gleichschnelles Wachstum der Leukämie in den Rezipientenmäusen hervorgerufen haben. Auch die Frequenz der leukämieinduzierenden Zellen in den beiden Fraktionen ist nahezu identisch. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen zum einen, dass die hier identifizierten und isolierten LRCs keine Artefakte oder sterbende Zellen sind, sondern voll

funktionsfähige, vitale ALL-Xenograftzellen. Zum andern scheinen die LRCs schnell von ihrer Phase des sich langsamen Teilens oder Ruhens in eine hoch proliferative Phase wechseln zu können, da sie ein ebenso schnelles und früh einsetzendes Leukämiewachstum hervorrufen können, wie die sich bereits in einer proliferativen Phase befindlichen LLCs. Werden also Xenograftzellen in unterschiedlichen proliferativen Phasen aus ihrem Umfeld isoliert und erneut in NSG-Mäuse injiziert, sind sie dazu in der Lage, gleich schnell zu wachsen. Diese Beobachtung weist wiederum darauf hin, dass extrinsische Faktoren das Wachstumsverhalten der Xenograftzellen zu beeinflussen scheinen. Allerdings zeigen diese Ergebnisse auch, dass die LRC-Fraktion im Vergleich zu LLC-Fraktion nicht für LICs angereichert ist, obwohl die Zellen dieser Fraktion durch ihren ruhenden Charakter eine Eigenschaft von tumorinduzierenden Zellen aufweisen.

Bisher waren keine phänotypischen Charakterisierungen dazu in der Lage, eine Population von LICs in ALL-Patientenproben eindeutig von nicht-LICs abzugrenzen (Kong, Yoshida et al. 2008, le Viseur, Hotfilder et al. 2008). Auch der hier verwendeten funktionellen Charakterisierung gelang es nicht, eine Fraktion zu identifizieren, welche für LICs angereichert ist. Daher scheint das Vorhandensein einer LIC-Subfraktion und einer nicht-LIC-Fraktion in der ALL unwahrscheinlich, zumal nach den hier für Probe 199 vorliegenden Ergebnissen jede dreißigste Zelle ein LIC sein kann. Ähnlich hohe LIC-Frequenzen der ALL lassen sich in der Literatur finden (Rehe, Wilson et al. 2013). Berücksichtigt man, dass die Zellen vor ihrer Transplantation *ex vivo* behandelt wurden und nach ihrer Transplantation eine Xenotransplantationsbarriere überwinden mussten (McClellan und Majeti 2013), ist es sehr wahrscheinlich, dass jede einzelne Zelle das Potential hat, eine Leukämie auszulösen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass diese Eigenschaft unabhängig von den proliferativen Eigenschaften der Zellen ist. Die hier entstandenen Ergebnisse und die oben genannten Untersuchungen basierend auf der Expression von Reifemarker auf ALL-Zellen stellen das Vorhandensein einer abgegrenzten Subfraktion von LICs in der ALL in Frage und lassen vermuten, dass jede einzelne ALL-Zelle das Potential hat, eine LIC zu sein.

6.4. Chemoresistenz von LRCs

Konventionelle Chemotherapeutika, wie sie in der Klinik zur Behandlung von ALL verwendet werden, targetieren vorwiegend proliferierende Zellen (Valeriote und van Putten 1975, Drewinko, Patchen et al. 1981). Zu ihnen zählen Vincaalkaloide, Anthracycline oder andere Topoisomeraseinhibitoren, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden (Tabelle 14). Zellen, welche sich für die Dauer der Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika nicht teilen, könnten daher die Chemotherapie unbeschadet überstehen. Deshalb wurde die Apoptosesensitivität von LRCs im Vergleich zu LLCs der Proben 199 und 265 gegenüber Chemotherapeutika der oben genannten Stoffgruppen überprüft. Die Chemosensitivität dieser beiden Fraktionen der Probe 233 konnte nicht analysiert werden, da auf Grund der geringen Zellzahlen mit denen diese Probe sich entwickelt nicht genügend LRCs isoliert oder detektiert werden konnten.

Eine Auswertung der Apoptoseinduktion durch eine Stimulierung mit Chemotherapeutika *in vitro* von isolierten Xenograftzellen der LLC- und der LRC-Fraktion ergab, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Chemosensitivität zwischen Zellen der beiden Fraktionen gibt. Das Ergebnis ist unerwartet, da alle verwendeten Wirkstoffe sich teilende Zellen targetieren (Bensch und Malawista 1968, Minocha und Long 1984, Gewirtz 1999), wodurch die LRCs einen Überlebensvorteil haben sollten. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Substanzen bei einer Stimulierung *in vitro* unspezifische Wirkungen entfalten, obwohl darauf geachtet wurde Konzentrationen zu verwenden, welche im Plasma von Patienten gemessen wurden. Einer unspezifischen Toxizität durch Überdosierung widerspricht ebenfalls, dass in den meisten Fällen ein nicht geringer Anteil der Zellen die Stimulierung überlebt, wie im Fall der Stimulierung von Xenograftzellen der Probe 199 mit Vincristin.

In 6.2 und 6.3 wurde bereits diskutiert, dass das Umfeld der Xenograftzellen Einfluss auf ihre proliferativen Eigenschaften zu haben scheint. Durch die Isolierung der Zellen für ihre Stimulierung *in vitro* wurden diese jedoch ihrer Umgebung im Knochenmark beraubt. Sollte die Lokalisierung der Xenograftzellen ebenfalls Auswirkungen auf ihre Chemosensitivität haben, kann

dieser Effekt bei einer Stimulierung *in vitro* nicht untersucht werden. Um zu analysieren, ob ein Unterschied der Chemosensitivität der LRCs *in vivo* vorliegt, wurden diese in ihrem Umfeld im Knochenmark mit Chemotherapeutika behandelt. Dazu wurden Tiere mit Zellen der Proben 199 und 265 injiziert und darauf mit Wirkstoffen, welche ebenfalls für die Stimulierung *in vitro* verwendet wurden, behandelt.

Durch *in vivo* Bildgebung sowie durch die Quantifizierung der ALL-Xenograftzellen im Knochenmark wurde nachgewiesen, dass durch die Behandlung nicht nur eine Wachstumsinhibierung der ALL-Xenograftzellen im Knochenmark, sondern auch eine Reduktion der Leukämie verursacht wird. Durchflusszytometrische Analysen der isolierten Xenograftzellen zeigten, dass der Anteil der LRCs durch die Behandlung zunimmt und dass sowohl bei Probe 199 als auch Probe 265 die Anzahl der LRCs, im Gegensatz zur Anzahl aller Xenograftzellen, durch die Therapie nicht reduziert wird. Dem zur Folge sind die LRCs *in vivo* chemoresistent, was bei ihrer Stimulierung *in vitro* nicht der Fall ist.

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse bei einer Stimulierung *in vivo* im Vergleich zu einer Stimulierung *in vitro* scheint das Umfeld der Xenograftzellen auch für ihre Apoptosesensitivität eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Reduktion der Proliferation und der Chemosensitivität sowie die damit verbundene Abhängigkeit der Lokalisierung der LRCs im Knochenmark lassen sich dadurch erklären, dass die LRCs in weniger gut mit Nährstoffen versorgten Regionen des Knochenmarks vorkommen. Durch die schlechtere Versorgung mit Nährstoffen könnten die LRCs in ihrem Zellzyklus arretiert sein (Pardee 1974, Norbury und Nurse 1992). Eine schlechtere Versorgung mit Nährstoffen könnte auch einen geringeren Kontakt mit Chemotherapeutika bedeuten, wodurch sich die hier festgestellte Resistenz erklären würde.

Allerdings weisen die LRCs mit ihrer Chemoresistenz auch eine Eigenschaft auf, welche mit Krebsstammzellen in Verbindung gebracht wird (Wang 2007). Im Falle von Leukämie-Stammzellen, könnte es möglich sein, dass sie sich in der hämatopoetischen Nische aufhalten und mit dieser interagieren und somit vor Chemotherapie geschützt sind (Lane, Scadden et al. 2009), wodurch sie die Therapie überleben und nach ihrem Ende eine Neubildung der Leukämie induzieren könnten. Eine Interaktion der LRCs mit der hämatopoetischen Nische

würde auch ihre reduzierte Proliferation erklären, da ein direkter Zusammenhang zwischen Zellruhe von normalen hämatopoetischen Stammzellen und ihrer Lokalisierung in der hämatopoetischen Nische bekannt ist (Arai, Hirao et al. 2004, Wilson, Laurenti et al. 2008). Eine Chemoresistenz von hämatopoetischen Stammzellen auf Grund ihrer Lokalisation in der Nische und der damit verbundenen Zellruhe konnte ebenfalls bereits gezeigt werden (Cheng, Rodrigues et al. 2000).

Ob der schützende Effekt des Umfeldes der LRCs durch ihre direkte Interaktion mit einer Nische zustande kommt, oder durch einen reduzierten Kontakt mit den Wirkstoffen auf Grund ihrer schlecht versorgten Lokalisierung, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Nichts desto trotz handelt es sich auf Grund ihrer Chemoresistenz bei den LRCs um eine interessante Subpopulation, da sie Zellen der posttherapeutischen minimalen Resterkrankung entsprechen könnten, welche zu einem späteren Zeitpunkt einen Rückfall des Patienten verursachen (Lane, Scadden et al. 2009).

6.5. Vergleichende Genexpressionsanalysen

Aufgrund ihrer interessanten Eigenschaften sollten die in dieser Arbeit identifizierten LRC-Xenograftzellen an Hand des Vergleichs mit LLCs weiter charakterisiert werden. Durch die limitierte Anzahl der zur Verfügung stehenden Zellen und dem hohen Aufwand, mit dem ihre Isolierung verbunden ist, wurde eine Analysemethode angewendet, welche eine möglichst ganzheitliche Charakterisierung von wenigen Zellen zulässt. Da bereits ausgeschlossen wurde, dass Unterschiede zwischen LLCs und LRCs durch verschiedene Subklone zustande kommen, verspricht ein Vergleich auf genomischer Ebene wenig Erfolg. Deshalb wurden Transkriptomanalysen von LLCs und LRCs der Xenograftprobe 265 durchgeführt, um diese anschließend mit einander zu vergleichen. Da nur sehr geringe Mengen von LRCs isoliert werden können, konnte kein herkömmliches Protokoll zur Analyse des Transkriptoms verwendet werden, weshalb die Expertise der Projektgruppe "Personalisierte Tumorthherapie" des Fraunhofer ITEM-R zu Rate gezogen wurde. Der Projektgruppe gelang es, ein Protokoll zu etablieren, mit dem das Transkriptom einer einzelnen Zelle analysiert werden kann (Polzer, Hartmann et al. 2009). Diese

Kooperationspartner führten an cDNA Array-Untersuchungen durch. Allerdings steht eine Validierung der Hochdurchsatz-Daten durch weitere Methoden und an weiteren Daten noch aus.

Bei dem Vergleich der Transkriptomdaten wurde festgestellt, dass bei den 50 Genen, deren Expression sich zwischen den LLC- und LRC-Fraktion am stärksten unterscheidet, vorwiegend Gene in der LRC-Fraktion runter reguliert sind. Die runter regulierten Gene codieren unter anderem für Proteine, welche an der Proteinproduktion, der Zellentwicklung und Differenzierung, der Zellteilung und der Energieproduktion beteiligt sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die LRCs, im Vergleich zu den LLCs, in einer Phase der Zellruhe und reduzierten Produktivität befinden. Diese Eigenschaften der LRCs bestätigen die bereits zuvor getroffenen Rückschlüsse aufgrund ihres hohen CFSE-Signals. Dadurch ist nachgewiesen, dass sich zum Zeitpunkt der Fixierung für die Transkriptomanalyse und trotz der bereits erfolgten Isolierung aus dem Knochenmark die LRCs von den LLCs immer noch signifikant unterscheiden.

Bei weiteren vergleichenden Analysen der Transkriptome der LLCs und der LRCs konnte festgestellt werden, dass die Oberflächenproteine Tie2, VCAM-1 und LFA-1 in den LRCs signifikant stärker exprimiert werden als in den Zellen der LLC-Fraktion (Tabelle 16). Tie2 und VCAM-1 sind Zelladhäsionsproteine, welche als Marker für therapieresistente Tumorzellen bekannt sind (Schmidmaier, Mörsdorf et al. 2006, Zhi, Wang et al. 2010). Tie2 wird außerdem spezifisch auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert und unterstützt in diesen die Interaktion mit der extrazellulären Matrix und zellulären Komponenten der hämatopoetischen Nische (Arai, Hirao et al. 2004). Des Weiteren wurde in einem Mausmodell gezeigt, dass Tie2-Interaktionen die Zellruhe von hämatopoetischen Stammzellen erhält (Puri und Bernstein 2003). In Menschen wird Ang-1, der Ligand von Tie2, in mesenchymalen Stammzellen exprimiert, was vermuten lässt, dass diese Zellen eine Nische für ruhende humane hämatopoetische Stammzellen bilden (Sacchetti, Funari et al. 2007).

VCAM-1 wird auf hämatopoetischen Zellen exprimiert, wo seine Expression in ruhenden Zellen höher ist, als in mobilisierten Zellen (Ulyanova, Scott et al. 2005). LFA-1 ist nachweislich an der Adhäsion von Lymphozyten an Osteoblasten beteiligt (Tanaka, Mine et al. 1998). Osteoblasten wiederum sind

ein entscheidender Baustein der hämatopoetischen Nische und sind für die Lokalisierung von hämatopoetischen Stammzellen in der Region des Endosteums verantwortlich (Zhang, Niu et al. 2003).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die LRCs intensiver mit der Nische von hämatopoetischen Stammzellen interagieren als LLCs, wodurch eine Reduktion oder Inhibierung der Proliferation der Xenograftzellen induziert wird.

6.6. Zusammenfassung und Hypothese

Zusammengefasst zeigen die in dieser Arbeit präsentierten Daten, dass Xenograftzellen der akuten lymphatischen Leukämie im Knochenmark von NSG-Mäusen ein heterogenes Wachstumsverhalten zeigen. Es treten sowohl schnell als auch langsam proliferierende Xenograftzellen auf. Die Ursache für das unterschiedliche Wachstumsverhalten der Xenograftzellen ist nicht intrinsisch begründet, sondern scheint vom Umfeld der Zellen ausgelöst zu werden. Vergleichende Genexpressionsanalysen konnten zeigen, dass die langsam proliferierenden Zellen Proteine exprimieren, welche auf eine Interaktion mit der hämatopoetischen Stammzellnische hinweisen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die sich selten teilenden Zellen im Gegensatz zu den schnell proliferierenden Zellen chemoresistent sind. Aus diesen Ergebnissen lässt sich eine Hypothese zusammenfassen, welche in Abbildung 43 gezeigt ist.

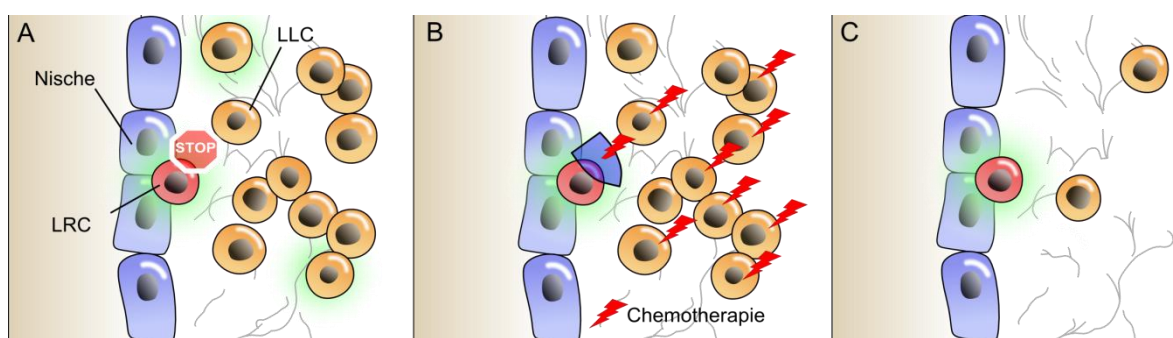


Abbildung 43: Hypothese

Einige ALL-Xenograftzellen lassen sich in der Nische der hämatopoetischen Stammzellen nieder. Durch eine Interaktion mit der Nische werden diese Zellen an ihrer Proliferation gehindert (A). Da die Xenograftzellen in der Nische nicht proliferieren, überleben sie, im Gegensatz zu den LLCs, eine Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika (B). Nach Abschluss der Behandlung könnten die überlebenden LRCs ein erneutes auswachsen der Xenograftzellen einleiten (C).

Die in dieser Arbeit beschriebenen LRCs weisen die Fähigkeit auf, von einem Status der reduzierten Proliferation oder Zellruhe zu stark proliferierenden Zellen zu wechseln. Sie scheinen mit ihrer Mikroumgebung zu kommunizieren und sind chemoresistent. Nach einer erneuten Transplantation in immunkomprimierte Mäuse sind sie in der Lage zu engraften. Außerdem sind sie versatil, da sie nach ihrer Transplantation eine Leukämie im Endstadium hervorrufen können. Abgesehen von der Fähigkeit zur Selbsterneuerung, welche noch nicht untersucht wurde, weisen die LRCs alle Eigenschaften von tumorinduzierenden Zellen bzw. Krebsstammzellen auf (Reya, Morrison et al. 2001, Jordan 2007, Dick 2008, Gires 2011). Allerdings weist die LRC-Fraktion, im Vergleich zu der hier beschriebenen LLC-Fraktion, keine erhöhte LIC-Frequenz auf, was den allgemein anerkannten Nachweis für eine Heterogenität des Tumors und für die Identifizierung von Krebsstammzellen darstellen würde (Dalerba, Cho et al. 2007, Dick 2008). Indes ist zu berücksichtigen, dass bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, sowie in der Literatur beschriebenen Ergebnissen für die ALL (le Viseur, Hotfilder et al. 2008, McClellan und Majeti 2013, Rehe, Wilson et al. 2013), keine Fraktion identifiziert werden konnte, welche keine LICs enthält, und scheinbar jede einzelne ALL-Zelle dazu in der Lage ist, nach ihrer Transplantation in eine immunkomprimierte Maus eine Leukämie hervorzurufen.

Es wird angenommen, dass in der B-ALL ein Wechsel von Zellen mit einem reiferen B-Zell-Phänotyp in Zellen mit einem weniger reifen B-Zell-Phänotyp, und umgekehrt, möglich ist (McClellan und Majeti 2013). Trifft diese Annahme zu, ist es auch denkbar, dass ein dynamisches Gleichgewicht aus ruhenden LRCs, welche chemoresistent sind, und schnell proliferierenden LLCs besteht. Sollte dieser Fall zutreffen, würde dem ohnehin schon komplexen und für die Therapie schwer zu berücksichtigenden Krebsstammzellkonzept eine weitere, komplizierende Variante hinzugefügt werden, welche bei der Therapie der ALL berücksichtigt werden muss.

Ein Faktor, welcher bei der oben beschriebene Dynamik in der ALL eine Rolle spielen könnte, ist die Interaktion der Leukämiezellen mit der Stammzellnische des hämatopoetischen Systems (Lane, Scadden et al. 2009). Die Nische könnte der entscheidende Faktor sein, welcher dafür verantwortlich ist, ob eine ALL-Zelle sich wie eine LRC oder LLC verhält. Daher könnten neue Therapieansätze

die Interaktion zwischen ALL-Zellen und der hämatopoetischen Nische als Ziel haben, wobei allerdings berücksichtigt werden muss, dass Interaktionen, welche für die normale Hämatopoese wichtig sind, geschont werden sollten.

6.7. Weiterführende Untersuchungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von LRCs und ihrer Lokalisierung in der hämatopoetischen Stammelnische bestehen könnte. Um bestätigen zu können, welches Umfeld das Vorhandensein von LRCs begünstigt, könnte ihre Lokalisierung im Knochen ermittelt werden. Dazu könnten immunhistochemische Analysen verwendet werden, welche bereits dazu verwendet wurden, die Lokalisierung frisch transplanteder hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark zu bestimmen (Ellis, Grassinger et al. 2011). Das Auftreten von ruhenden AML-Xenograftzellen im Endosteum des Knochens konnte bereits mittels Immunfluoreszenzmikroskopie festgestellt werden (Saito, Uchida et al. 2010). Könnten ruhende Zellen der in dieser Arbeit verwendeten Xenograftproben ebenfalls im Endosteum gefunden werden, würde dies die Hinweise auf eine Interaktion mit der hämatopoetischen Nische bestätigen.

Bisher wurde nicht geklärt, ob Xenograftzellen aufgrund einer stochastischen Verteilung zu LRCs werden, oder ob zum Beispiel eine limitierte Anzahl von verfügbaren Nischen dafür verantwortlich ist. Um einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von LRCs und einer verfügbaren Anzahl von Nischen zu untersuchen, könnten unterschiedliche Mengen von CFSE-gefärbten ALL-Xenograftzellen in NSG-Mäuse injiziert werden. Sollten unabhängig von der injizierten Zellzahl immer gleich viele LRCs isoliert werden, würde das dafür sprechen, dass eine limitierte Anzahl verfügbarer Nischen für das Vorhandensein von LRCs verantwortlich ist und keine stochastische Verteilung der Zellen.

Um zu untersuchen, ob eine Aktivierung der Zellteilung in den ruhenden Zellen die Effektivität einer Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika erhöht, könnten Tiere mit Zytokinen behandelt werden, welche die ruhenden Zellen in die Teilung treiben und somit therapiesensitiver machen könnten. Vergleichbare

Versuche wurden in Xenograft-Modellen bereits mit AML-Zellen durchgeführt (Saito, Uchida et al. 2010).

Zur Bestätigung der Ergebnisse der erhöhten Expression von Tie2, VCAM-1 und LFA-1 auf LRCs sollten zunächst ebenfalls Genexpressionsanalysen mit LLC- und LRCs der Proben 199 und 233 durchgeführt werden. Sollten dadurch die Ergebnisse der bereits durchgeführten Analysen bestärkt werden, sollten diese mit weiteren Methoden, wie qPCR auf Transkriptomebene sowie mit durchflusszytometrischen Analysen auf Proteinebene, verifiziert werden. Sollten sich die Ergebnisse der gesamt-Transkriptomanalyse bestätigen, könnte untersucht werden, ob die Inhibierung eines der Oberflächenmarker, zum Beispiel mit einem inhibierenden Antikörper, Einflüsse auf das Engraftment der Proben oder das Vorhandensein von LRCs hat. Effektiver aber auch aufwändiger könnte die Notwendigkeit von Tie2, VCAM-1 oder LFA-1 für die Entstehung für LRCs mittels eines Knockdowns der Proteine festgestellt werden. Des Weiteren könnte versucht werden, Tie2, LFA-1 oder VCAM-1-positive Subfraktionen von ALL-Xenograftzellen mittels FACS aus dem Knochenmark zu isolieren und diese zu charakterisieren. Das Vorhandensein dieser Fraktion könne auch in anderen Organen, wie der Leber oder der Milz, untersucht werden.

Es ist bekannt, dass der Ang-1/Tie2-Signaling den Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg aktiviert (Shiojima und Walsh 2002). Der PI3K/Akt-Signalweg reguliert auch viele Zellzyklusregulatoren wie den CDK-Inhibitor p21^{Cip1} (Arai und Suda 2007). Deshalb könnte der Ang-1/Tie2-Signalweg auch den CDK-Inhibitor p21^{Cip1} durch den PI3K/Akt-Signalweg regulieren, was zur proliferativen Ruhe der ALL-Zellen führen könnte. Daher könnte untersucht werden, ob ein PI3K/Akt-Inhibitor wie BEZ235 (Maira, Stauffer et al. 2008) den Anteil der LRCs in vivo reduziert, und ob eine kombinierte Behandlung aus einem der herkömmlichen Chemotherapeutika mit BEZ235 effektiver ist, als eine Behandlung mit nur einem der beiden Wirkstoffe.

6.8. Ausblick

Die in dieser Arbeit beschriebene Methode zur Isolierung von ruhenden ALL-Xenograftzellen kann in Zukunft dazu verwendet werden, diese chemoresistente und dadurch therapierelevante Subfraktion von Tumorzellen genau zu charakterisieren. Die Entwicklung neuer Therapien gegen ruhende Tumorzellen ist ausgesprochen wichtig, weil diese zu einem Rückfall der Erkrankung führen.

Neue Therapien könnten gezielt ruhende Zellen targetieren, in dem zum Beispiel charakteristische Oberflächenmarker auf diesen als Ziele für therapeutische Antikörper verwendet werden könnten. Ein weiterer Ansatz zur Therapie von ruhenden Zellen wäre es, diese gezielt aus ihrer proliferativen Ruhe in einen Zustand der Zellteilung zu bringen, wodurch sie anfällig für konventionelle Chemotherapie werden würden.

Ebenso ist denkbar, die Interaktionen zwischen ruhenden Tumorzellen und den Faktoren, welche die proliferative Ruhe induzieren, zu unterbrechen. Im Fall der in dieser Arbeit vorgestellten Hypothese würde dies eine gezielte Inhibierung der Interaktion zwischen ALL-Zelle und der Nische der hämatopoetischen Stammzellen bedeuten.

Das Ziel einer Beseitigung von ruhenden Tumorzellen ist es, das Auftreten von Resterkrankungen nach konventioneller Chemotherapie zu reduzieren, die Krankheits-Rückfallrate zu verringern und letztlich die Prognose der Patienten mit ALL zu verbessern.

7. Literatur

Adams, D. J., L. van der Weyden, A. Mayeda, S. Stamm, B. J. Morris and J. E. Rasko (2001). "ZNF265—a novel spliceosomal protein able to induce alternative splicing." The Journal of cell biology **154**(1): 25-32.

Afenya, E. (2001). "Use of real time leukaemia data to validate model predictions based on analyses and computer simulations." Cell Proliferation **34**(6): 331-345.

Afenya, E. K. and C. P. Calderón (2000). "Diverse ideas on the growth kinetics of disseminated cancer cells." Bulletin of Mathematical Biology **62**(3): 527-542.

Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison and M. F. Clarke (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(7): 3983-3988.

Almendo, V., A. Marusyk and K. Polyak (2013). "Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer." Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease **8**: 277-302.

Alves, C. C., N. Terziyska, M. Grunert, S. Gündisch, U. Graubner, L. Quintanilla-Martinez and I. Jeremias (2012). "Leukemia-initiating cells of patient-derived acute lymphoblastic leukemia xenografts are sensitive toward TRAIL." Blood **119**(18): 4224-4227.

An, G., F. Wu and M. Morris (2011). "5,7-Dimethoxyflavone and Multiple Flavonoids in Combination Alter the ABCG2-Mediated Tissue Distribution of Mitoxantrone in Mice." Pharmaceutical Research **28**(5): 1090-1099.

Arai, F., A. Hirao, M. Ohmura, H. Sato, S. Matsuoka, K. Takubo, K. Ito, G. Y. Koh and T. Suda (2004). "Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in the Bone Marrow Niche." Cell **118**(2): 149-161.

Arai, F. and T. Suda (2007). "Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche." Annals of the New York Academy of Sciences **1106**(1): 41-53.

Araujo, R. and D. McElwain (2004). "A history of the study of solid tumour growth: the contribution of mathematical modelling." Bulletin of mathematical biology **66**(5): 1039-1091.

Atuegwu, N. C., L. R. Arlinghaus, X. Li, A. B. Chakravarthy, V. G. Abramson, M. E. Sanders and T. E. Yankeelov (2013). "Parameterizing the Logistic Model of Tumor Growth by DW-MRI and DCE-MRI Data to Predict Treatment Response and Changes in Breast Cancer Cellularity during Neoadjuvant Chemotherapy." Translational oncology **6**(3): 256.

Bansal, N. and D. Banerjee (2009). "Tumor initiating cells." Current Pharmaceutical Biotechnology **10**(2): 192-196.

Barker, N., J. H. van Es, J. Kuipers, P. Kujala, M. van den Born, M. Cozijnsen, A. Haegebarth, J. Korving, H. Begthel, P. J. Peters and H. Clevers (2007).

"Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5." Nature **449**(7165): 1003-1007.

Bassukas, I. D., G. Hofmockel, P. Tsatalpas, V. Eberle and B. Maurer-Schultze (1996). "Prognostic relevance of the intrinsic growth deceleration of the first passage xenografts of human renal cell carcinomas." Cancer **78**(10): 2170-2172.

Bensch, K. G. and S. E. Malawista (1968). "Microtubule crystals: a new biophysical phenomenon induced by Vinca alkaloids."

Blagosklonny, M. (2005). "Target for cancer therapy: proliferating cells or stem cells." Leukemia **20**(3): 385-391.

Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nature medicine **3**(7): 730-737.

Brú, A., S. Albertos, J. Luis Subiza, J. L. García-Asenjo and I. Brú (2003). "The Universal Dynamics of Tumor Growth." Biophysical Journal **85**(5): 2948-2961.

Calvi, L., G. Adams, K. Weibrecht, J. Weber, D. Olson, M. Knight, R. Martin, E. Schipani, P. Divieti and F. Bringhurst (2003). "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche." Nature **425**(6960): 841-846.

Casciari, J. J., S. V. Sotirchos and R. M. Sutherland (1992). "Variations in tumor cell growth rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration, and extracellular pH." Journal of cellular physiology **151**(2): 386-394.

Cheng, T., N. Rodrigues, H. Shen, Y.-g. Yang, D. Dombkowski, M. Sykes and D. T. Scadden (2000). "Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1." Science **287**(5459): 1804-1808.

Christofidou-Solomidou, M., Y. Liu, D. E. Elder, S. Albelda and G. Cotsarelis (1999). Human hair follicle bulge cells are biochemically distinct and possess an epithelial stem cell phenotype. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, Nature Publishing Group.

Civalleri, D., M. O. Vannozzi, F. DeCian, G. Lunardi, M. Steinweg, I. Pastrone, M. Viale and M. Esposito (2002). "Intraperitoneal mitoxantrone: a feasibility and pharmacokinetic study." European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology **28**(2): 172-179.

Coller, H. A., L. Sang and J. M. Roberts (2006). "A new description of cellular quiescence." PLoS biology **4**(3): e83.

Collins, A. T., P. A. Berry, C. Hyde, M. J. Stower and N. J. Maitland (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." Cancer research **65**(23): 10946-10951.

Corbett, T., L. Polin, P. LoRusso, F. Valeriote, C. Panchapor, S. Pugh, K. White, J. Knight, L. Demchik, J. Jones, L. Jones and L. Lisow (2004). In Vivo Methods for Screening and Preclinical Testing. Anticancer Drug Development Guide. B. Teicher and P. Andrews, Humana Press: 99-123.

Cotsarelis, G., T.-T. Sun and R. M. Lavker (1990). "Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis." Cell **61**(7): 1329-1337.

Crean, S., J. Meneski, T. Hullinger, M. Reilly, E. DeBoever and R. Taichman (2004). "N-linked sialylated sugar receptors support haematopoietic cell-osteoblast adhesions." British journal of haematology **124**(4): 534-546.

Dalerba, P., R. W. Cho and M. F. Clarke (2007). "Cancer stem cells: models and concepts." Annu. Rev. Med. **58**: 267-284.

Dembinski, J. L. and S. Krauss (2009). "Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subpopulation in pancreas adenocarcinoma." Clinical & experimental metastasis **26**(7): 611-623.

Dick, J. E. (2008). "Stem cell concepts renew cancer research." Blood **112**(13): 4793-4807.

Drewinko, B., M. Patchen, L.-Y. Yang and B. Barlogie (1981). "Differential killing efficacy of twenty antitumor drugs on proliferating and nonproliferating human tumor cells." Cancer research **41**(6): 2328-2333.

Dull, T., R. Zufferey, M. Kelly, R. J. Mandel, M. Nguyen, D. Trono and L. Naldini (1998). "A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System." Journal of Virology **72**(11): 8463-8471.

Duvill  , B., M. Attali, V. Aiello, E. Quemeneur and R. Scharfmann (2003). "Label-Retaining Cells in the Rat Pancreas: Location and Differentiation Potential in Vitro." Diabetes **52**(8): 2035-2042.

Ehrhardt, H., D. Schrembs, C. Moritz, F. Wachter, S. Haldar, U. Graubner, M. Nathrath and I. Jeremias (2011). "Optimized anti-tumor effects of anthracyclines plus Vinca alkaloids using a novel, mechanism-based application schedule." Blood **118**(23): 6123-6131.

Ellis, S. L., J. Grassinger, A. Jones, J. Borg, T. Camenisch, D. Haylock, I. Bertoncello and S. K. Nilsson (2011). "The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature." Blood **118**(6): 1516-1524.

Embree, L., K. Gelmon, A. Tolcher, N. Hudon, J. Heggie, C. Dedhar, P. Logan, M. B. Bally and L. D. Mayer (1998). "Pharmacokinetic behavior of vincristine sulfate following administration of vincristine sulfate liposome injection." Cancer Chemotherapy and Pharmacology **41**(5): 347-352.

Estlin, E. J., M. Ronghe, G. A. A. Burke and S. M. Yule (2000). "The Clinical and Cellular Pharmacology Of Vincristine, Corticosteroids, L-Asparaginase,

Anthracyclines and Cyclophosphamide In Relation To Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia." British Journal of Haematology **110**(4): 780-790.

Fehse, B., A. Uhde, N. Fehse, H.-G. Eckert, J. Clausen, R. Rüger, S. Koch, W. Ostertag, A. R. Zander and M. Stockschröder (1997). "Selective immunoaffinity-based enrichment of CD34+ cells transduced with retroviral vectors containing an intracytoplasmically truncated version of the human low-affinity nerve growth factor receptor (Δ LNNGFR) gene." Human gene therapy **8**(15): 1815-1824.

Francia, G., W. Cruz-Munoz, S. Man, P. Xu and R. S. Kerbel (2011). "Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics." Nature Reviews Cancer **11**(2): 135-141.

Gewirtz, D. (1999). "A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin." Biochemical pharmacology **57**(7): 727-741.

Gires, O. (2011). "Lessons from common markers of tumor-initiating cells in solid cancers." Cellular and Molecular Life Sciences **68**(24): 4009-4022.

Haeno, H., M. Gonen, M. B. Davis, J. M. Herman, C. A. Iacobuzio-Donahue and F. Michor (2012). "Computational modeling of pancreatic cancer reveals kinetics of metastasis suggesting optimum treatment strategies." Cell **148**(1): 362-375.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Hanazawa, S., S. Amano, K. Nakada, Y. Ohmori, T. Miyoshi, K. Hirose and S. Kitano (1987). "Biological characterization of interleukin-1-like cytokine produced by cultured bone cells from newborn mouse calvaria." Calcified tissue international **41**(1): 31-37.

Hande, K. R., P. J. Wedlund, R. M. Noone, G. R. Wilkinson, F. A. Greco and S. N. Wolff (1984). "Pharmacokinetics of High-Dose Etoposide (VP-16-213) Administered to Cancer Patients." Cancer Research **44**(1): 379-382.

Hart, D., E. Shochat and Z. Agur (1998). "The growth law of primary breast cancer as inferred from mammography screening trials data." British journal of cancer **78**(3): 382.

Hoffman, R. M. (2008). "A better fluorescent protein for whole-body imaging." Trends in biotechnology **26**(1): 1-4.

Hu, C.-C. A., S. K. Dougan, A. M. McGehee, J. C. Love and H. L. Ploegh (2009). "XBP-1 regulates signal transduction, transcription factors and bone marrow colonization in B cells." The EMBO journal **28**(11): 1624-1636.

Hu, Y. and G. K. Smyth (2009). "ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays." Journal of Immunological Methods **347**(1-2): 70-78.

Huynh, H., P. K. H. Chow and K.-C. Soo (2007). "AZD6244 and doxorubicin induce growth suppression and apoptosis in mouse models of hepatocellular carcinoma." Molecular Cancer Therapeutics **6**(9): 2468-2476.

Ishikawa, F., S. Yoshida, Y. Saito, A. Hijikata, H. Kitamura, S. Tanaka, R. Nakamura, T. Tanaka, H. Tomiyama, N. Saito, M. Fukata, T. Miyamoto, B. Lyons, K. Ohshima, N. Uchida, S. Taniguchi, O. Ohara, K. Akashi, M. Harada and L. D. Shultz (2007). "Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region." Nat Biotech **25**(11): 1315-1321.

Iwama, A., I. Hamaguchi, M. Hashiyama, Y. Murayama, K. Yasunaga and T. Suda (1993). "Molecular Cloning and Characterization of Mouse TIE and TEK Receptor Tyrosine Kinase Genes and Their Expression in Hematopoietic Stem Cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **195**(1): 301-309.

Jaks, V., N. Barker, M. Kasper, J. H. Van Es, H. J. Snippert, H. Clevers and R. Toftgård (2008). "Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells." Nature genetics **40**(11): 1291-1299.

Jordan, C. T. (2007). "The leukemic stem cell." Best Practice & Research Clinical Haematology **20**(1): 13-18.

Kemper, K., M. R. Sprick, M. de Bree, A. Scopelliti, L. Vermeulen, M. Hoek, J. Zeilstra, S. T. Pals, H. Mehmet and G. Stassi (2010). "The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation." Cancer research **70**(2): 719-729.

Kitagawa, K., D. Skowyra, S. J. Elledge, J. W. Harper and P. Hieter (1999). "< i>SGT1</i> Encodes an Essential Component of the Yeast Kinetochore Assembly Pathway and a Novel Subunit of the SCF Ubiquitin Ligase Complex." Molecular cell **4**(1): 21-33.

Köhler, A., V. Schmithorst, M.-D. Filippi, M. A. Ryan, D. Daria, M. Gunzer and H. Geiger (2009). "Altered cellular dynamics and endosteal location of aged early hematopoietic progenitor cells revealed by time-lapse intravital imaging in long bones." Blood **114**(2): 290-298.

Kong, Y., S. Yoshida, Y. Saito, T. Doi, Y. Nagatoshi, M. Fukata, N. Saito, S. M. Yang, C. Iwamoto, J. Okamura, K. Y. Liu, X. J. Huang, D. P. Lu, L. D. Shultz, M. Harada and F. Ishikawa (2008). "CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38-CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL." Leukemia **22**(6): 1207-1213.

Kumar, M., B. Keller, N. Makalou and R. E. Sutton (2001). "Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors." Human gene therapy **12**(15): 1893-1905.

Laloti, V. S., S. Vergarajauregui, A. Villasante, D. Pulido and I. V. Sandoval (2013). "C6orf89 encodes three distinct HDAC enhancers that function in the nucleolus, the golgi and the midbody." Journal of cellular physiology **228**(9): 1907-1921.

Lane, S. W., D. T. Scadden and D. G. Gilliland (2009). "The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities." Blood **114**(6): 1150-1157.

le Viseur, C., M. Hotfilder, S. Bomken, K. Wilson, S. Röttgers, A. Schrauder, A. Rosemann, J. Irving, R. W. Stam, L. D. Shultz, J. Harbott, H. Jürgens, M. Schrappe, R. Pieters and J. Vormoor (2008). "In Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, Blasts at Different Stages of Immunophenotypic Maturation Have Stem Cell Properties." Cancer cell **14**(1): 47-58.

Lee, E. M., P. S. Bachmann and R. B. Lock (2007). "Xenograft models for the preclinical evaluation of new therapies in acute leukemia." Leukemia & Lymphoma **48**(4): 659-668.

Legha, S. S. (1986). "Vincristine neurotoxicity." Medical toxicology **1**(6): 421-427.

Leong, K. G., B.-E. Wang, L. Johnson and W.-Q. Gao (2008). "Generation of a prostate from a single adult stem cell." Nature **456**(7223): 804-808.

Li, L. and T. Xie (2005). "Stem cell niche: structure and function." Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **21**: 605-631.

Liedo, P., D. Orozco and J. Vaupel (1992). "Slowing of mortality rates at older ages in large medfly cohorts." Science **258**(5081): 457-461.

Liem, N. L., R. A. Papa, C. G. Milross, M. A. Schmid, M. Tajbakhsh, S. Choi, C. D. Ramirez, A. M. Rice, M. Haber and M. D. Norris (2004). "Characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia xenograft models for the preclinical evaluation of new therapies." Blood **103**(10): 3905-3914.

Lunardi, G., M. O. Vannozzi, C. Bighin, L. Del Mastro, I. Stevani, G. Schettini and M. Venturini (2003). "Influence of trastuzumab on epirubicin pharmacokinetics in metastatic breast cancer patients." Annals of Oncology **14**(8): 1222-1226.

Lyons, A. B. and C. R. Parish (1994). "Determination of lymphocyte division by flow cytometry." Journal of Immunological Methods **171**(1): 131-137.

Lyons, S. K. (2005). "Advances in imaging mouse tumour models in vivo." The Journal of Pathology **205**(2): 194-205.

Maira, S.-M., F. Stauffer, J. Brueggen, P. Furet, C. Schnell, C. Fritsch, S. Brachmann, P. Chène, A. De Pover and K. Schoemaker (2008). "Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity." Molecular cancer therapeutics **7**(7): 1851-1863.

McClellan, J. S. and R. Majeti (2013). "The cancer stem cell model: B cell acute lymphoblastic leukaemia breaks the mould." EMBO molecular medicine **5**(1): 7-9.

Mehrara, E., E. Forssell-Aronsson, V. Johanson, L. Kölby, R. Hultborn and P. Bernhardt (2013). "A new method to estimate parameters of the growth model for metastatic tumours." Theoretical Biology and Medical Modelling **10**(1): 31.

Meydan, N., T. Grunberger, H. Dadi, M. Shahar, E. Arpaia, Z. Lapidot, J. S. Leeder, M. Freedman, A. Cohen and A. Gazit (1996). "Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor."

Meyer, L. H. and K.-M. Debatin (2011). "Diversity of Human Leukemia Xenograft Mouse Models: Implications for Disease Biology." Cancer Research **71**(23): 7141-7144.

Minocha, A. and B. H. Long (1984). "Inhibition of the DNA catenation activity of type II topoisomerase by VP16-213 and VM26." Biochemical and Biophysical Research Communications **122**(1): 165-170.

Möhle, R., S. Murea, M. Kirsch and R. Haas (1995). "Differential expression of L-selectin, VLA-4, and LFA-1 on CD34+ progenitor cells from bone marrow and peripheral blood during G-CSF-enhanced recovery." Experimental hematology **23**(14): 1535-1542.

Moore, K. A. and I. R. Lemischka (2006). "Stem Cells and Their Niches." Science **311**(5769): 1880-1885.

Moore, N., J. Houghton and S. Lyle (2012). "Slow-Cycling Therapy-Resistant Cancer Cells." Stem Cells and Development **21**(10): 1822-1830.

Naldini, L., U. Blömer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma and D. Trono (1996). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." Science **272**(5259): 263-267.

Nilsson, S. K., H. M. Johnston and J. A. Coverdale (2001). "Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches." Blood **97**(8): 2293-2299.

Norbury, C. and P. Nurse (1992). "Animal cell cycles and their control." Annual review of biochemistry **61**(1): 441-468.

Norton, L. (1988). "A Gompertzian model of human breast cancer growth." Cancer research **48**(24 Part 1): 7067-7071.

O'Neill, K., S. K. Lyons, W. M. Gallagher, K. M. Curran and A. T. Byrne (2010). "Bioluminescent imaging: a critical tool in pre-clinical oncology research." The Journal of Pathology **220**(3): 317-327.

O'Brien, C. A., A. Pollett, S. Gallinger and J. E. Dick (2006). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." Nature **445**(7123): 106-110.

Ogawa, T., Y. Mimura, K. Isowa, H. Kato, M. Mitsuishi, T. Toyoshi, N. Kuwayama, H. Morimoto, M. Murakoshi and T. Nakayama (2001). "An antimicrotubule agent, TZT-1027, does not induce neuropathologic alterations which are detected after administration of vincristine or paclitaxel in animal models." Toxicology Letters **121**(2): 97-106.

Osawa, M., K.-i. Hanada, H. Hamada and H. Nakauchi (1996). "Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell." Science **273**(5272): 242-245.

Pardee, A. B. (1974). "A restriction point for control of normal animal cell proliferation." Proceedings of the National Academy of Sciences **71**(4): 1286-1290.

Parish, C. R. (1999). "Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies." Immunol Cell Biol **77**(6): 499-508.

Paxton, J. W., S. N. Kim and L. R. Whitfield (1990). "Pharmacokinetic and Toxicity Scaling of the Antitumor Agents Amsacrine and CI-921, a New Analogue, in Mice, Rats, Rabbits, Dogs, and Humans." Cancer Research **50**(9): 2692-2697.

Polzer, B., C. H. Hartmann and C. A. Klein (2009). "Genome and transcriptome analysis of single tumor cells." Single Cell Analysis: Technologies and Applications: 235-249.

Potten, C. S., C. Booth, G. L. Tudor, D. Booth, G. Brady, P. Hurley, G. Ashton, R. Clarke, S. i. Sakakibara and H. Okano (2003). "Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1." Differentiation **71**(1): 28-41.

Punzel, M. and A. D. Ho (2001). "Divisional history and pluripotency of human hematopoietic stem cells." Annals of the New York Academy of Sciences **938**(1): 72-82.

Puri, M. C. and A. Bernstein (2003). "Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(22): 12753-12758.

Ralston, S. H. (1994). "Analysis of gene expression in human bone biopsies by polymerase chain reaction: evidence for enhanced cytokine expression in postmenopausal osteoporosis." Journal of Bone and Mineral Research **9**(6): 883-890.

Rehe, K., K. Wilson, S. Bomken, D. Williamson, J. Irving, M. L. den Boer, M. Stanulla, M. Schrappe, A. G. Hall and O. Heidenreich (2013). "Acute B lymphoblastic leukaemia-propagating cells are present at high frequency in diverse lymphoblast populations." EMBO molecular medicine **5**(1): 38-51.

Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.

Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, E. Pilozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle and R. De Maria (2006). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." Nature **445**(7123): 111-115.

Rosenthal, S. and S. Kaufman (1974). "Vincristine neurotoxicity." Annals of internal medicine **80**(6): 733-737.

Sacchetti, B., A. Funari, S. Michienzi, S. Di Cesare, S. Piersanti, I. Saggio, E. Tagliafico, S. Ferrari, P. G. Robey, M. Riminucci and P. Bianco (2007). "Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment." Cell **131**(2): 324-336.

Saito, Y., N. Uchida, S. Tanaka, N. Suzuki, M. Tomizawa-Murasawa, A. Sone, Y. Najima, S. Takagi, Y. Aoki, A. Wake, S. Taniguchi, L. D. Shultz and F. Ishikawa (2010). "Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in a mouse model of AML." Nat Biotech **28**(3): 275-280.

Sang, L., H. A. Collier and J. M. Roberts (2008). "Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1." Science **321**(5892): 1095-1100.

Santos, E. B., R. Yeh, J. Lee, Y. Nikhamin, B. Punzalan, B. Punzalan, K. La Perle, S. M. Larson, M. Sadelain and R. J. Brentjens (2009). "Sensitive in vivo imaging of T cells using a membrane-bound Gaussia princeps luciferase." Nature medicine **15**(3): 338-344.

Schmidmaier, R., K. Mörsdorf, P. Baumann, B. Emmerich and G. Meinhardt (2006). "Evidence for cell adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma cells in vivo." Int J Biol Markers **21**(4): 218-222.

Schofield, R. (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell." Blood cells **4**(1-2): 7-25.

Shackleton, M., F. Vaillant, K. J. Simpson, J. Stingl, G. K. Smyth, M.-L. Asselin-Labat, L. Wu, G. J. Lindeman and J. E. Visvader (2006). "Generation of a functional mammary gland from a single stem cell." Nature **439**(7072): 84-88.

Shcherbo, D., E. M. Merzlyak, T. V. Chepurnykh, A. F. Fradkov, G. V. Ermakova, E. A. Solovieva, K. A. Lukyanov, E. A. Bogdanova, A. G. Zarsky and S. Lukyanov (2007). "Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging." Nature methods **4**(9): 741-746.

Shen, W.-F., S. Rozenfeld, A. Kwong, L. G. Kömüves, H. J. Lawrence and C. Largman (1999). "HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells." Molecular and cellular biology **19**(4): 3051-3061.

Shiojima, I. and K. Walsh (2002). "Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis." Circulation Research **90**(12): 1243-1250.

Shmelkov, S. V., J. M. Butler, A. T. Hooper, A. Hormigo, J. Kushner, T. Milde, R. S. Clair, M. Baljevic, I. White and D. K. Jin (2008). "CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133–metastatic colon cancer cells initiate tumors." The Journal of clinical investigation **118**(6): 2111.

Shultz, L. D., F. Ishikawa and D. L. Greiner (2007). "Humanized mice in translational biomedical research." Nature Reviews Immunology **7**(2): 118-130.

Shultz, L. D., B. L. Lyons, L. M. Burzenski, B. Gott, X. Chen, S. Chaleff, M. Kotb, S. D. Gillies, M. King, J. Mangada, D. L. Greiner and R. Handgretinger (2005).

"Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-scid IL2R γ null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells." The Journal of Immunology **174**(10): 6477-6489.

Simmons, P. J., A. Zannettino, S. Gronthos and D. Leavesley (1994). "Potential adhesion mechanisms for localisation of haemopoietic progenitors to bone marrow stroma." Leukemia & lymphoma **12**(5-6): 353-363.

Spradling, A., D. Drummond-Barbosa and T. Kai (2001). "Stem cells find their niche." Nature **414**(6859): 98-104.

Spratt, J. A., D. von Fournier, J. S. Spratt and E. E. Weber (1993). "Decelerating growth and human breast cancer." Cancer **71**(6): 2013-2019.

Taichman, R. S. and S. G. Emerson (1998). "The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment." Stem Cells **16**(1): 7-15.

Takizawa, H., R. R. Regoes, C. S. Boddupalli, S. Bonhoeffer and M. G. Manz (2011). "Dynamic variation in cycling of hematopoietic stem cells in steady state and inflammation." The Journal of Experimental Medicine **208**(2): 273-284.

Tanaka, Y., S. Mine, T. Hanagiri, T. Hiraga, I. Morimoto, C. G. Figdor, Y. van Kooyk, H. Ozawa, T. Nakamura and K. Yasumoto (1998). "Constitutive up-regulation of integrin-mediated adhesion of tumor-infiltrating lymphocytes to osteoblasts and bone marrow-derived stromal cells." Cancer research **58**(18): 4138-4145.

Tanaka, Y., I. Morimoto, Y. Nakano, Y. Okada, S. Hirota, S. Nomura, T. Nakamura and S. Eto (1995). "Osteoblasts are regulated by the cellular adhesion through ICAM-1 and VCAM-1." Journal of Bone and Mineral Research **10**(10): 1462-1469.

Taussig, D. C., F. Miraki-Moud, F. Anjos-Afonso, D. J. Pearce, K. Allen, C. Ridler, D. Lillington, H. Oakervee, J. Cavenagh and S. G. Agrawal (2008). "Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells." Blood **112**(3): 568-575.

Taussig, D. C., F. Miraki-Moud, F. Anjos-Afonso, D. J. Pearce, K. Allen, C. Ridler, D. Lillington, H. Oakervee, J. Cavenagh, S. G. Agrawal, T. A. Lister, J. G. Gribben and D. Bonnet (2008). "Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells." Blood **112**(3): 568-575.

Taussig, D. C., J. Vargaftig, F. Miraki-Moud, E. Griessinger, K. Sharrock, T. Luke, D. Lillington, H. Oakervee, J. Cavenagh and S. G. Agrawal (2010). "Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34 $^{-}$ fraction." Blood **115**(10): 1976-1984.

Terziyska, N., C. C. Alves, V. Groiss, K. Schneider, K. Farkasova, M. Ogris, E. Wagner, H. Ehrhardt, R. J. Brentjens, U. zur Stadt, M. Horstmann, L. Quintanilla-Martinez and I. Jeremias (2012). "In Vivo Imaging Enables High Resolution

Preclinical Trials on Patients' Leukemia Cells Growing in Mice." PLoS ONE **7**(12): e52798.

Tomayko, M. and C. P. Reynolds (1989). "Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice." Cancer Chemotherapy and Pharmacology **24**(3): 148-154.

Uchida, N., D. W. Buck, D. He, M. J. Reitsma, M. Masek, T. V. Phan, A. S. Tsukamoto, F. H. Gage and I. L. Weissman (2000). "Direct isolation of human central nervous system stem cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(26): 14720-14725.

Uechi, T., T. Tanaka and N. Kenmochi (2001). "A complete map of the human ribosomal protein genes: assignment of 80 genes to the cytogenetic map and implications for human disorders." Genomics **72**(3): 223-230.

Ulyanova, T., L. M. Scott, G. V. Priestley, Y. Jiang, B. Nakamoto, P. A. Koni and T. Papayannopoulou (2005). "VCAM-1 expression in adult hematopoietic and nonhematopoietic cells is controlled by tissue-inductive signals and reflects their developmental origin." Blood **106**(1): 86-94.

Vaidya, V. G. and F. J. Alexandro Jr (1982). "Evaluation of some mathematical models for tumor growth." International journal of bio-medical computing **13**(1): 19-35.

Valeriote, F. and L. van Putten (1975). "Proliferation-dependent cytotoxicity of anticancer agents: a review." Cancer research **35**(10): 2619-2630.

Viatour, P., T. C. Somervaille, S. Venkatasubrahmanyam, S. Kogan, M. E. McLaughlin, I. L. Weissman, A. J. Butte, E. Passegué and J. Sage (2008). "Hematopoietic stem cell quiescence is maintained by compound contributions of the retinoblastoma gene family." Cell stem cell **3**(4): 416-428.

Wang, J. C. Y. (2007). "Evaluating Therapeutic Efficacy against Cancer Stem Cells: New Challenges Posed by a New Paradigm." Cell stem cell **1**(5): 497-501.

Watt, F. M. and K. B. Jensen (2009). "Epidermal stem cell diversity and quiescence." EMBO molecular medicine **1**(5): 260-267.

Weiskirchen, R. and A. M. Gressner (2000). "The cysteine-and glycine-rich LIM domain protein CRP2 specifically interacts with a novel human protein (CRP2BP)." Biochemical and biophysical research communications **274**(3): 655-663.

Wiedemann, G., O. Mella, S. Roszinski, C. Weiss and T. Wagner (1992). "Hyperthermia enhances mitoxantrone cytotoxicity on human breast carcinoma and sarcoma xenografts in nude mice." International journal of radiation oncology, biology, physics **24**(4): 669-673.

Wilson, A., E. Laurenti, G. Oser, R. C. van der Wath, W. Blanco-Bose, M. Jaworski, S. Offner, C. F. Dunant, L. Eshkind, E. Bockamp, P. Lió, H. R. MacDonald and A. Trumpp (2008). "Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch

from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair." Cell **135**(6): 1118-1129.

Yin, T. and L. Li (2006). "The stem cell niches in bone." Journal of Clinical Investigation **116**(5): 1195-1201.

Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W.-G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson and J. Q. Feng (2003). "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size." Nature **425**(6960): 836-841.

Zhi, L., M. Wang, Q. Rao, F. Yu, Y. Mi and J. Wang (2010). "Enrichment of N-Cadherin and Tie2-bearing CD34+/CD38-/CD123+ leukemic stem cells by chemotherapy-resistance." Cancer letters **296**(1): 65-73.

Zufferey, R., J. E. Donello, D. Trono and T. J. Hope (1999). "Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element Enhances Expression of Transgenes Delivered by Retroviral Vectors." Journal of Virology **73**(4): 2886-2892.

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Irmela Jeremias und Herrn Prof. Dr. Olivier Gires bedanken, die es mir ermöglicht haben meine Doktorarbeit durchzuführen. Sie waren in den vergangenen Jahren eine große Unterstützung und stets offen für (nicht nur) wissenschaftliche Diskussionen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Vigo Heissmeyer und Prof. Dr. Gunnar Schotta, die mit vielen Ideen und wissenschaftlichen Diskussionen viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein großer Dank geht vor allem auch an Frau Dr. Catarina Alves, für die vielen Ideen, Diskussionen und ihrer unendlich erscheinenden Ruhe und Geduld.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Jan Hassenauer, Dr. Michael Polzer und Dr. Stefan Kirch für die stets angenehme und ertragreiche Zusammenarbeit im Rahmen von Kooperationen.

Ein Danke geht auch an meine Kollegen und ehemaligen Kollegen Ulrike Borgmeier, Michela Carlet, Maike Fritschle, Alexandra Graupner, Michaela Grunert, Volker Groß, Sarah Huntenburg, Fabian Klein, Liliana Mura, Erbey Özedemir, Nadia Terziyska, Jenny Vergalli und Binje Vick für die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank geht an meinen ehemaligen Kommilitonen, Kollegen und langjährigen Freund Volker, für dessen Mitwirken und Unterstützen in allen Lagen.

Besonders bei Volker, sowie Nadine Sandhöfer und Harald Polzer möchte ich mich an dieser Stelle für ihre Unterstützung, das Zuhören und die eine oder andere Ablenkung fernab des Labors bedanken.

Mein größter Dank geht an meine Familie: Sieglinde, Karl-Friedrich, Florian, Steffi, Kurt, Bernadette, Hans, Elsa, Renate und besonders meiner Verlobten Verena. Sie sind mein Rückhalt und unterstützen mich in allen Lebenslagen.